

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



524972

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
4. März 2004 (04.03.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2004/018693 A2

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12P 23/00,  
C12N 9/14, 15/82, 9/02, 9/10, 9/88, A01H 5/02

(DE). KLEBSATTEL, Martin [DE/DE]; Weingarten 9,  
06484 Quedlinburg (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/009102

(74) Anwalt: DÖRPER, Thomas; c/o BASF Aktiengesellschaft, ., 67056 Ludwigshafen (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:

18. August 2003 (18.08.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

102 38 980.2	20. August 2002 (20.08.2002)	DE
102 38 978.0	20. August 2002 (20.08.2002)	DE
102 38 979.9	20. August 2002 (20.08.2002)	DE
102 53 112.9	13. November 2002 (13.11.2002)	DE
102 58 971.2	16. Dezember 2002 (16.12.2002)	DE

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): SUNGENE GMBH & CO.KGAA [DE/DE]; Corrensstr. 3, 06466 Gatersleben (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): SCHOPFER, Christel Renate [DE/DE]; Konvent 38, 06484 Quedlinburg (DE). FLACHMANN, Ralf [DE/DE]; Halberstädter Str. 20a, 06484 Quedlinburg (DE). HERBERS, Karin [DE/DE]; Am Hange 6, 06484 Quedlinburg (DE). KUNZE, Irene [DE/DE]; Mühlenweg 11, 06466 Gatersleben (DE). SAUER, Matt [DE/DE]; Markt 9, 06484 Quedlinburg

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR THE PRODUCTION OF KETOCAROTINOIDS IN FLOWER PETALS ON PLANTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON KETOCAROTINOIDEN IN BLÜTENBLÄTTERN VON PFLANZEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for the production of ketocarotinoids by means of the cultivation of plants, which have an altered ketolase activity in flower petals in comparison to the wild type, the genetically altered plants and the use thereof as human and animal foodstuffs and for the production of ketocarotinoid extracts.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern aufweisen, die genetisch veränderten Pflanzen, sowie deren Verwendung als Nahrungs- und Futtermittel und zur Herstellung von Ketocarotinoidextrakten.



WO 2004/018693 A2

# Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden in Blütenblättern von Pflanzen

## 5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität in Blüten-  
10 blättern aufweisen, die genetisch veränderten Pflanzen, sowie deren Verwendung als Nahrungs- und Futtermittel und zur Herstellung von Ketocarotinoidextrakten.

Carotinoide werden de novo in Bakterien, Algen, Pilzen und  
15 Pflanzen synthetisiert. Ketocarotinoide, also Carotinoide, die mindestens eine Keto-Gruppe enthalten, wie beispielsweise Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin sind natürliche Antioxidantien und Pigmente, die von einigen Algen und  
20 Mikroorganismen als Sekundärmetabolite produziert werden.

Aufgrund ihrer farbgebenden Eigenschaften werden die Ketocarotinoide und insbesondere Astaxanthin als Pigmentierhilfsstoffe in der Tierernährung, insbesondere in der Forellen-, Lachs- und  
25 Shrimpszucht verwendet.

Die Herstellung von Astaxanthin erfolgt heutzutage größtenteils durch chemische Syntheseverfahren. Natürliche Ketocarotinoide, wie beispielsweise natürliches Astaxanthin, werden heutzutage in  
30 biotechnologischen Verfahren in kleinen Mengen durch Kultivierung von Algen, beispielsweise *Haematococcus pluvialis* oder durch Fermentation von gentechnologisch optimierten Mikroorganismen und anschließender Isolierung gewonnen.

35 Ein wirtschaftliches biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von natürlichen Ketocarotinoiden ist daher von großer Bedeutung.

Aus WO 00/32788 ist es bekannt, durch kombinierte Überexpression von Carotinoid-Biosynthesegenen und Antisense-Verfahren bestimmte  
40 Carotinoidverhältnisse in Tagetespetalen zu beeinflussen.

WO 98/18910 beschreibt die Synthese von Ketocarotinoiden in Nektarien von Tabakblüten durch Einbringen eines Ketolase-Gens in Tabak.



## 2

WO 01/20011 beschreibt ein DNA Konstrukt zur Produktion von Ketocarotinoiden, insbesondere Astaxanthin, in Samen von Ölsaatpflanzen wie Raps, Sonnenblume, Sojabohne und Senf unter Verwendung eines Samen-spezifischen Promotors und einer Ketolase  
5 aus Haematococcus.

Die in WO 98/18910 und WO 01/20011 offenbarten Verfahren liefern zwar genetisch veränderte Pflanzen, die in spezifischen Geweben einen Gehalt an Ketocarotinoiden aufweisen, weisen jedoch den  
10 Nachteil auf, dass die Höhe des Gehalts an Ketocarotinoiden und die Reinheit, insbesondere an Astaxanthin noch nicht zufriedenstellend ist.

Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, ein alternatives  
15 Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von Pflanzen zur Verfügung zu stellen, bzw. weitere transgene Pflanzen, die Ketocarotinoide herstellen, zur Verfügung zu stellen, die optimierte Eigenschaften, wie beispielsweise einen höheren Gehalt an Ketocarotinoiden aufweisen und den geschilderten  
20 Nachteil des Standes der Technik nicht aufweisen.

Demgemäß wurde ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden gefunden, indem man genetisch veränderte Pflanzen kultiviert, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität in  
25 Blütenblättern aufweisen.

Bis auf wenige Ausnahmen abgesehen, wie beispielsweise das Adonisröschen, enthalten Pflanzen und insbesondere die Blütenblätter, die auch Petalen genannt werden, zwar Carotinoide, aber  
30 keine Ketocarotinoide. In der Regel weisen daher die Blütenblätter von Wildtyppflanzen keine Ketolase-Aktivität auf.

In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden daher als Ausgangspflanzen Pflanzen verwendet, die bereits als  
35 Wildtyp in Blütenblättern eine Ketolaseaktivität aufweisen, wie beispielsweise das Adonisröschen. In dieser Ausführungsform bewirkt die genetische Veränderung eine Erhöhung der Ketolase-Aktivität in Blütenblättern.

40 Unter Ketolase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Ketolase verstanden.

Unter einer Ketolase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, gegebenenfalls substituierten,  
45  $\beta$ -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Keto-Gruppe einzuführen.

## 3

Insbesondere wird unter einer Ketolase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\beta$ -Carotin in Canthaxanthin umzuwandeln.

- 5 Dementsprechend wird unter Ketolase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Ketolase umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin bzw. gebildete Menge Canthaxanthin verstanden.

- Bei einer erhöhten Ketolase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird  
10 somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Ketolase die umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin bzw. die gebildete Menge Canthaxanthin erhöht.

- Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Ketolase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt  
15 mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Ketolase-Aktivität des Wildtyps.

- 20 Unter dem Begriff "Wildtyp" wird erfindungsgemäß die entsprechende nicht genetisch veränderte Ausgangspflanze verstanden.

- Je nach Zusammenhang kann unter dem Begriff "Pflanze" die Ausgangspflanze (Wildtyp) oder eine erfindungsgemäße, genetisch ver-  
25 änderte Pflanze oder beides verstanden werden.

- Vorzugsweise und insbesondere in Fällen, in denen die Pflanze oder der Wildtyp nicht eindeutig zugeordnet werden kann, wird unter "Wildtyp" für die Erhöhung oder Verursachung der Ketolase-  
30 Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-  
35 Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Aktivität, für die nachstehend  
40 beschriebene Erhöhung der Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der Phytoen-Synthase-Aktivität,  
45 für die nachstehend beschriebene Erhöhung der Phytoen-Desaturase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene

Erhöhung der crtISO-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der FtsZ-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der MinD-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität und für die nachstehend  
5 beschriebene Reduzierung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Aktivität und die Erhöhung des Gehalts an Ketocarotinoiden jeweils eine Referenzpflanze verstanden.

Diese Referenzpflanze ist für Pflanzen, die bereits als Wildtyp  
10 eine Ketolase-Aktivität in Blütenblätter aufweisen vorzugsweise *Adonis aestivalis*, *Adonis flammeus* oder *Adonis annuus*, besonders bevorzugt *Adonis aestivalis*.

Diese Referenzpflanze ist für Pflanzen, die als Wildtyp keine Ketolase-Aktivität in Blütenblätter aufweisen, vorzugsweise *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Tagetes lucida*, *Tagetes pringlei*, *Tagetes palmeri*, *Tagetes minuta* oder *Tagetes campanulata*, besonders  
15 bevorzugt *Tagetes erecta*.

20 Die Bestimmung der Ketolase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

Die Bestimmung der Ketolase-Aktivität in Pflanzenmaterial erfolgt  
25 in Anlehnung an die Methode von Frazer et al., (J. Biol. Chem. 272(10): 6128-6135, 1997). Die Ketolase-Aktivität in pflanzlichen Extrakten wird mit den Substraten beta-Carotin und Canthaxanthin in Gegenwart von Lipid (Sojalecithin) und Detergens (Natriumcho-  
lat) bestimmt. Substrat/Produkt-Verhältnisse aus den Ketolase-  
30 Assays werden mittels HPLC ermittelt.

Die Erhöhung der Ketolase-Aktivität kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Translations- und Proteinebene oder  
35 durch Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Ketolase gegenüber dem Wildtyp, beispielsweise durch Induzierung des Ketolase-Gens durch Aktivatoren oder durch Einbringen von Nukleinsäuren kodierend eine Ketolase in die Pflanze.

40 Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Ketolase wird erfindungsgemäß in dieser Ausführungsform auch die Manipulation der Expression der Pflanzen eigenen endogenen Ketolasen verstanden. Dies kann beispielsweise durch Veränderung der Promotor DNA-Sequenz für Ketolase kodierende Gene erreicht  
45 werden. Eine solche Veränderung, die eine veränderte oder vorzugsweise erhöhte Expressionsrate mindestens eines endogenen

## 5

Ketolase Gens zur Folge hat, kann durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

Es ist wie vorstehend beschrieben möglich, die Expression mindestens einer endogenen Ketolase durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdsubstanzen erfolgen.

10 Des weiteren kann eine erhöhte Expression mindestens eines endogenen Ketolase-Gens dadurch erzielt werden, dass ein in der Wildtyppflanze nicht vorkommendes oder modifiziertes Regulatorprotein mit dem Promotor dieser Gene in Wechselwirkung tritt.

15 Solch ein Regulator kann ein chimäres Protein darstellen, welches aus einer DNA-Bindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne besteht, wie beispielsweise in WO 96/06166 beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Ketolase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Ketolase durch Einbringen von Nukleinsäuren, die Ketolasen kodieren, in die Pflanze.

In den erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen liegt also in dieser Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres Ketolase-Gen vor. In dieser Ausführungsform weist die erfindungsgemäße genetisch veränderte Pflanze dementsprechend mindestens eine exogene (=heterologe) Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, auf oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, auf

35

In einer anderen, bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden als Ausgangspflanzen Pflanzen verwendet, die als Wildtyp in Blütenblättern keine Ketolaseaktivität aufweisen, wie beispielsweise *Tomate*, *Marigold*, *Tagetes erecta*, *Tagetes lucida*, *Tagetes minuta*, *Tagetes pringlei*, *Tagetes palmeri* und *Tagetes campanulata*.

In dieser, bevorzugten Ausführungsform verursacht die genetische Veränderung die Ketolase-Aktivität in Blütenblättern. Die erfindungsgemäße genetisch veränderte Pflanze weist somit in dieser, bevorzugten Ausführungsform im Vergleich zum genetisch nicht veränderten Wildtyp eine Ketolase-Aktivität in Blüten-

## 6

blättern auf und ist somit vorzugsweise in der Lage, in Blütenblättern transgen eine Ketolase zu exprimieren.

In dieser bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Verursachung  
5 der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Ketolase analog zu der vorstehend beschriebenen Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Ketolase vorzugsweise durch Einbringen von Nukleinsäuren, die Ketolasen kodieren in die Ausgangspflanze.

10

Dazu kann in beiden Ausführungsformen prinzipiell jedes Ketolase-Gen, also jede Nukleinsäuren die eine Ketolase kodiert verwendet werden.

15 Alle in der Beschreibung erwähnten Nukleinsäuren können beispielsweise eine RNA-, DNA- oder cDNA-Sequenz sein.

Bei genomischen Ketolase-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall, dass die Wirtspflanze  
20 nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Ketolase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

25 Beispiele für Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase und die entsprechenden Ketolasen, die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können sind beispielsweise Sequenzen aus

Haematoccus pluvialis, insbesondere aus Haematoccus pluvialis  
30 Flotow em. Wille (Accession NO: X86782; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 1, Protein SEQ ID NO: 2),

Haematoccus pluvialis, NIES-144 (Accession NO: D45881; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 3, Protein SEQ ID NO: 4),

35

Agrobacterium aurantiacum (Accession NO: D58420; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 5, Protein SEQ ID NO: 6),

Aliccaligenes spec. (Accession NO: D58422; Nukleinsäure:  
40 SEQ ID NO: 7, Protein SEQ ID NO: 8),

Paracoccus marcusii (Accession NO: Y15112; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 9, Protein SEQ ID NO: 10).

45 Synechocystis sp. Strain PC6803 (Accession NO: NP442491; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 11, Protein SEQ ID NO: 12).

## 7

*Bradyrhizobium* sp. (Accession NO: AF218415; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 13, Protein SEQ ID NO: 14).

*Nostoc* sp. Strain PCC7120 (Accession NO: AP003592, BAB74888;  
5 Nukleinsäure: SEQ ID NO: 15, Protein SEQ ID NO: 16).

*Haematococcus pluvialis*  
(Accession NO: AF534876, AAN03484; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 81,  
Protein : SEQ ID NO: 82)

10

*Paracoccus* sp. MBIC1143  
(Accession NO: D58420, P54972; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 83,  
Protein : SEQ ID NO: 84)

15 *Brevundimonas aurantiaca*  
(Accession NO: AY166610, AAN86030; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 85,  
Protein : SEQ ID NO: 86)

*Nodularia spumigena* NSOR10  
20 (Accession NO: AY210783, AAO64399; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 87,  
Protein : SEQ ID NO: 88)

*Nostoc punctiforme* ATCC 29133  
(Accession NO: NZ\_AABC01000195, ZP\_00111258; Nukleinsäure: SEQ ID  
25 NO: 89, Protein : SEQ ID NO: 90)

*Nostoc punctiforme* ATCC 29133  
(Accession NO: NZ\_AABC01000196; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 91,  
Protein : SEQ ID NO: 92)

30

*Deinococcus radiodurans* R1  
(Accession NO: E75561, AE001872; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 93,  
Protein : SEQ ID NO: 94)

35 Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase-Gene,  
die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können,  
lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren  
genomische Sequenz bekannt ist, durch Identitätsvergleiche der  
Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten

40 Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit den vorstehend  
beschriebenen Sequenzen und insbesondere mit den Sequenzen  
SEQ ID NO: 2 und/oder 16 und/oder 90 und/oder 92 leicht auf-  
finden.

45 Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase-Gene  
lassen sich weiterhin ausgehend von den vorstehend beschriebenen  
Nukleinsäuresequenzen, insbesondere ausgehend von den Sequenzen

SEQ ID NO: 2 und/oder 16 und/oder 90 und/oder 92 aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungstechniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

5

Die Hybridisierung kann unter moderaten (geringe Stringenz) oder vorzugsweise unter stringenten (hohe Stringenz) Bedingungen erfolgen.

- 10 Solche Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise bei Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., in: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 be-
- 15 geschrieben.

- Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrilles ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit geringer Stringenz (mit 2X SSC bei 50°C) und solchen mit
- 20 hoher Stringenz (mit 0.2X SSC bei 50°C, bevorzugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3 M Natriumcitrat, 3 M Natriumchlorid, pH 7.0).

- Darüberhinaus kann die Temperatur während des Waschschrilles von moderaten Bedingungen bei Raumtemperatur, 22°C, bis zu stringenten
- 25 Bedingungen bei 65°C angehoben werden.

- Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden. Während der
- 30 Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50 % Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt.

- Einige beispielhafte Bedingungen für Hybridisierung und Waschs-
- 35 schritt sind infolge gegeben:

(1) Hybridisierungsbedingungen mit zum Beispiel

40 (i) 4X SSC bei 65°C, oder

(ii) 6X SSC bei 45°C, oder

(iii) 6X SSC bei 68°C, 100 mg/ml denaturierter Fischsperma-DNA, oder

45

## 9

- (iv) 6X SSC, 0.5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA bei 68°C, oder
- 5 (v) 6XSSC, 0.5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA, 50 % Formamid bei 42°C, oder
- (vi) 50 % Formamid, 4X SSC bei 42°C, oder
- 10 (vii) 50 % (vol/vol) Formamid, 0.1 % Rinderserumalbumin, 0.1 % Ficoll, 0.1 % Polyvinylpyrrolidon, 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 6.5, 750 mM NaCl, 75 mM Natriumcitrat bei 42°C, oder
- (viii) 2X oder 4X SSC bei 50°C (moderate Bedingungen), oder
- 15 (ix) 30 bis 40 % Formamid, 2X oder 4X SSC bei 42° (moderate Bedingungen).
- (2) Waschschritte für jeweils 10 Minuten mit zum Beispiel
- 20 (i) 0.015 M NaCl/0.0015 M Natriumcitrat/0.1 % SDS bei 50°C, oder
- (ii) 0.1X SSC bei 65°C, oder
- 25 (iii) 0.1X SSC, 0.5 % SDS bei 68°C, oder
- (iv) 0.1X SSC, 0.5 % SDS, 50 % Formamid bei 42°C, oder
- 30 (v) 0.2X SSC, 0.1 % SDS bei 42°C, oder
- (vi) 2X SSC bei 65°C (moderate Bedingungen).

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren bringt man Nukleinsäuren ein, die ein Protein kodieren, 35 enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 %, vorzugsweise mindestens 30 %, bevorzugter mindestens 40 40 %, bevorzugter mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 60 %, bevorzugter mindestens 70 %, bevorzugter mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist.

45

Dabei kann es sich um eine natürliche Ketolase-Sequenz handeln, die wie vorstehend beschrieben durch Identitätsvergleich der



## 10

Sequenzen aus anderen Organismen gefunden werden kann oder um eine künstliche Ketolase-Sequenz die ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 2 durch künstliche Variation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgewandelt 5 wurde.

In einer weiteren, bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren bringt man Nukleinsäuren ein die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 16 oder 10 eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 %, vorzugsweise mindestens 30 %, bevorzugter mindestens 40 %, bevorzugter mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 60 %, bevorzugter mindestens 70 %, bevorzugter mindestens 80 %, 15 besonders bevorzugt mindestens 90 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 16 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist.

Dabei kann es sich um eine natürliche Ketolase-Sequenz handeln, 20 die, wie vorstehend beschrieben, durch Identitätsvergleich der Sequenzen aus anderen Organismen gefunden werden kann oder um eine künstliche Ketolase-Sequenz die ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 16 durch künstliche Variation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgewandelt 25 wurde.

In einer weiteren, bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren bringt man Nukleinsäuren ein die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 90 oder 30 eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 %, vorzugsweise mindestens 30 %, bevorzugter mindestens 40 %, bevorzugter mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 60 %, bevorzugter mindestens 70 %, bevorzugter mindestens 80 %, 35 besonders bevorzugt mindestens 90 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 90 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist.

Dabei kann es sich um eine natürliche Ketolase-Sequenz handeln, 40 die, wie vorstehend beschrieben, durch Identitätsvergleich der Sequenzen aus anderen Organismen gefunden werden kann oder um eine künstliche Ketolase-Sequenz die ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 90 durch künstliche Variation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgewandelt 45 wurde.

## 11

In einer weiteren, bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren bringt man Nukleinsäuren ein die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 92 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 %, vorzugsweise mindestens 30 %, bevorzugter mindestens 40 %, bevorzugter mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 60 %, bevorzugter mindestens 70 %, bevorzugter mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 92 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist.

Dabei kann es sich um eine natürliche Ketolase-Sequenz handeln, die, wie vorstehend beschrieben, durch Identitätsvergleich der Sequenzen aus anderen Organismen gefunden werden kann oder um eine künstliche Ketolase-Sequenz die ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 92 durch künstliche Variation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgewandelt wurde.

20

Unter dem Begriff "Substitution" ist in der Beschreibung der Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren durch eine oder mehrere Aminosäuren zu verstehen. Bevorzugt werden sog. konservative Austausche durchgeführt, bei denen die ersetzte Aminosäure eine ähnliche Eigenschaft hat wie die ursprüngliche Aminosäure, beispielsweise Austausch von Glu durch Asp, Gln durch Asn, Val durch Ile, Leu durch Ile, Ser durch Thr.

Deletion ist das Ersetzen einer Aminosäure durch eine direkte Bindung. Bevorzugte Positionen für Deletionen sind die Termini des Polypeptides und die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Proteindomänen.

Insertionen sind Einfügungen von Aminosäuren in die Polypeptidkette, wobei formal eine direkte Bindung durch ein oder mehrere Aminosäuren ersetzt wird.

Unter Identität zwischen zwei Proteinen wird die Identität der Aminosäuren über die jeweils gesamte Proteinelänge verstanden, insbesondere die Identität die durch Vergleich mit Hilfe der Lasergene Software der Firma DNASTAR, inc. Madison, Wisconsin (USA) unter Anwendung der Clustal Methode (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a micro-computer. Comput Appl. Biosci. 1989 Apr;5(2):151-1) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

## 12

Multiple alignment parameter:  
 Gap penalty 10  
 Gap length penalty 10  
 Pairwise alignment parameter:  
 5 K-tuple 1  
 Gap penalty 3  
 Window 5  
 Diagonals saved 5

- 10 Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit einer bestimmten Sequenz aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der bestimmten Sequenz insbesondere nach obigem Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz eine Identität  
 15 von mindestens 20 % aufweist.

- Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder 16 oder 90 oder 92 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden,  
 20 das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder 16 oder 90 oder 92, insbesondere nach obigem Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 20 % aufweist.

- 25 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend  
 30 der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

- In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine  
 35 Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 1 in die Pflanze ein.

- In einer weiteren, besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 15 in  
 40 die Pflanze ein.

In einer weiteren, besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 89 in die Pflanze ein.

## 13

In einer weiteren, besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 91 in die Pflanze ein.

- 5 Alle vorstehend erwähnten Ketolase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann  
10 beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, S. 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden  
15 in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man genetisch veränderte Pflanzen,  
20 die in Blüten die höchste Expressionsrate einer Ketolase aufweisen.

Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, das die Genexpression der Ketolase unter Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors  
25 erfolgt. Beispielsweise werden dazu die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, wie nachstehend ausführlich beschrieben, in einem Nukleinsäurekonstrukt, funktionell verknüpft mit einem blütenspezifischen Promotor in die Pflanze eingebracht.

- 30 Unter Pflanzen werden erfindungsgemäß vorzugsweise Pflanzen verstanden, die als Wildtyp in Blütenblättern Chromoplasten aufweisen. Weiter bevorzugte Pflanzen weisen als Wildtyp in den Blütenblättern zusätzlich Carotinoide, insbesondere  $\beta$ -Carotin, Zeaxanthin, Neoxanthin, Violaxanthin oder Lutein auf. Weiter bevorzugte Pflanzen weisen als Wildtyp in den Blütenblättern zusätzlich eine Hydroxylase-Aktivität auf.  
35

Unter Hydroxylase -Aktivität wird die Enzymaktivität einer Hydroxylase verstanden.

40

Unter einer Hydroxylase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, gegebenenfalls substituierten,  $\beta$ -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Hydroxy-Gruppe einzuführen.

45

## 14

Insbesondere wird unter einer Hydroxylase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin oder Cantaxanthin in Astaxanthin umzuwandeln.

- 5 Dementsprechend wird unter Hydroxylase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin oder Cantaxanthin bzw. gebildete Menge Zeaxanthin oder Astaxanthin verstanden.
- 10 Besonders bevorzugte Pflanzen sind Pflanzen ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, 15 Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Illiaceae oder Lamiaceae.

- Ganz besonders bevorzugte Pflanzen sind ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzengattungen *Marigold*, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, 20 *Acacia*, *Aconitum*, *Adonis*, *Arnica*, *Aquilegia*, *Aster*, *Astragalus*, *Bignonia*, *Calendula*, *Caltha*, *Campanula*, *Canna*, *Centaurea*, *Cheiranthus*, *Chrysanthemum*, *Citrus*, *Crepis*, *Crocus*, *Curcubita*, *Cytisus*, *Delonia*, *Delphinium*, *Dianthus*, *Dimorphotheca*, *Doronicum*, *Eschscholtzia*, *Forsythia*, *Fremontia*, *Gazania*, *Gelsemium*, *Genista*, 25 *Gentiana*, *Geranium*, *Gerbera*, *Geum*, *Grevillea*, *Helenium*, *Helianthus*, *Hepatica*, *Heracleum*, *Hisbiscus*, *Heliopsis*, *Hypericum*, *Hypochoeris*, *Impatiens*, *Iris*, *Jacaranda*, *Kerria*, *Laburnum*, *Lathyrus*, *Leontodon*, *Lilium*, *Linum*, *Lotus*, *Lycopersicon*, *Lysimachia*, *Maratia*, *Medicago*, *Mimulus*, *Narcissus*, *Oenothera*, *Osmanthus*, *Petunia*, 30 *Photinia*, *Physalis*, *Phyteuma*, *Potentilla*, *Pyracantha*, *Ranunculus*, *Rhododendron*, *Rosa*, *Rudbeckia*, *Senecio*, *Silene*, *Silphium*, *Sinapsis*, *Sorbus*, *Spartium*, *Tecoma*, *Torenia*, *Tragopogon*, *Trollius*, *Tropaeolum*, *Tulipa*, *Tussilago*, *Ulex*, *Viola* oder *Zinnia*, besonders bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzengattungen *Mari-* 35 *gold*, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Lycopersicon*, *Rosa*, *Calendula*, *Physalis*, *Medicago*, *Helianthus*, *Chrysanthemum*, *Aster*, *Tulipa*, *Narcissus*, *Petunia*, *Geranium*, *Tropaeolum* oder *Adonis*.

- In einer bevorzugten Ausführungsform werden Pflanzen kultiviert, 40 die gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und/oder  $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen.

Unter Hydroxylase-Aktivität die Enzymaktivität einer Hydroxylase verstanden.

## 15

Unter einer Hydroxylase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, gegebenenfalls substituierten,  $\beta$ -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Hydroxy-Gruppe einzuführen.

- 5 Insbesondere wird unter einer Hydroxylase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin oder Cantaxanthin in Astaxanthin umzuwandeln.

- 10 Dementsprechend wird unter Hydroxyase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin oder Cantaxanthin bzw. gebildete Menge Zeaxanthin oder Astaxanthin verstanden.

- Bei einer erhöhten Hydroxylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp  
15 wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase die umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin oder Cantaxanthin bzw. die gebildete Menge Zeaxanthin oder Astaxanthin erhöht.

- 20 Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Hydroxylase-Aktivität des Wild-  
25 typs.

Unter der nachstehend beschriebenen "endogenen  $\beta$ -Hydroxylase" wird die pflanzeneigene, endogene Hydroxylase verstanden. Die Bestimmung der Aktivität erfolgt analog.

30

Unter  $\beta$ -Cyclase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer  $\beta$ -Cyclase verstanden.

- Unter einer  $\beta$ -Cyclase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, einen endständigen, linearen Rest von  
35 Lycopin in einen  $\beta$ -Ionon-Ring zu überführen.

- Insbesondere wird unter einer  $\beta$ -Cyclase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\gamma$ -Carotin in  $\beta$ -Carotin  
40 umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter  $\beta$ -Cyclase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\beta$ -Cyclase umgesetzte Menge  $\gamma$ -Carotin bzw. gebildete Menge  $\beta$ -Carotin verstanden.

45

## 16

Bei einer erhöhten  $\beta$ -Cyclase -Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\beta$ -Cyclase die umgesetzte Menge  $\gamma$ -Carotin bzw. die gebildete Menge  $\beta$ -Carotin erhöht.

5

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere  
10 mindestens 600 % der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität des Wildtyps.

Die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

15

Die Aktivität der Hydroxylase wird nach Bouvier et al. (Biochim. Biophys. Acta 1391 (1998), 320-328) *in vitro* bestimmt. Es wird zu einer bestimmten Menge an Pflanzenextrakt Ferredoxin, Ferredoxin-NADP Oxidoreductase, Katalase, NADPH sowie beta-Carotin mit Mono-  
20 und Digalaktosylglyzeriden zugegeben.

Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität unter folgenden Bedingungen nach Bouvier, Keller, d'Harlingue und Camara (Xanthophyll biosynthesis: molecular and  
25 functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (Capsicum annuum L.; Biochim. Biophys. Acta 1391 (1998), 320-328):

Der *in-vitro* Assay wird in einem Volumen von 0.250 ml Volumen  
30 durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), 0.025 mg Ferredoxin von Spinat, 0.5 Einheiten Ferredoxin-NADP+ Oxidoreduktase von Spinat, 0.25 mM NADPH, 0.010 mg beta-Carotin (in 0.1 mg Tween 80 emulgiert), 0.05 mM einer Mischung von Mono- und Digalaktosylglyzeriden (1:1), 1 Einheit Katalase, 200 Mono-  
35 und Digalaktosylglyzeriden, (1:1), 0.2 mg Rinderserumalbumin und Pflanzenextrakt in unterschiedlichem Volumen. Die Reaktionsmischung wird 2 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Reaktionsprodukte werden mit organischem Lösungsmittel wie Aceton oder Chloroform/Methanol (2:1) extrahiert und mittels HPLC bestimmt.

40

Die Bestimmung der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

45 Die Aktivität der  $\beta$ -Cyclase wird nach Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15) *in vitro* bestimmt. Es werden zu einer bestimmten Menge an Pflanzenextrakt

## 17

Kaliumphosphat als Puffer (pH 7.6), Lycopin als Substrat, Stroma-protein von Paprika, NADP<sup>+</sup>, NADPH und ATP zugegeben.

Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung der Hydroxylase-  
5 Aktivität unter folgenden Bedingungen nach Bouvier, d'Harlingue und Camara (Molecular Analysis of carotenoid cyclase inhibition; Arch. Biochem. Biophys. 346(1) (1997) 53-64):

Der in-vitro Assay wird in einem Volumen von 250 µl Volumen  
10 durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), unterschiedliche Mengen an Pflanzenextrakt, 20 nM Lycopin, 250 µg an chromoplastidärem Stromaprotein aus Paprika, 0.2 mM NADP<sup>+</sup>, 0.2 mM NADPH und 1 mM ATP. NADP/NADPH und ATP werden in 10 µl Ethanol mit 1 mg Tween 80 unmittelbar vor der  
15 Zugabe zum Inkubationsmedium gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 30°C wird die Reaktion durch Zugabe von Chloroform/Methanol (2:1) beendet. Die in Chloroform extrahierten Reaktionsprodukte werden mittels HPLC analysiert.

20 Ein alternativer Assay mit radioaktivem Substrat ist beschrieben in Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15).

Die Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität und/oder β-Cyclase-  
25 Aktivität kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Expressions- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression von Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxylase und/oder von Nukleinsäuren kodierend eine β-Cyclase gegenüber dem Wildtyp.

30 Die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxylase und/oder die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäure kodierend eine β-Cyclase gegenüber dem Wildtyp kann ebenfalls durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch  
35 Induzierung des Hydroxylase-Gens und/oder β-Cyclase-Gens durch Aktivatoren oder durch Einbringen von einer oder mehrerer Hydroxylase-Genkopien und/oder β-Cyclase-Genkopien, also durch Einbringen mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine ε-Cyclase in die  
40 Pflanze.

Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase und/oder β-Cyclase wird erfindungsgemäß auch die Manipulation der Expression der Pflanzen eigenen, endogenen  
45 Hydroxylase und/oder β-Cyclase verstanden.



## 18

Bei bestimmten Pflanzen, bei denen der Schwerpunkt der Biosynthese auf dem  $\alpha$ -Carotinoid-Weg liegt, wie beispielsweise Pflanzen der Gattung Tagetes, ist es vorteilhaft, die endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität zu reduzieren und die Aktivität von  
5 exogenen Hydroxylasen zu erhöhen.

Dies kann beispielsweise durch Veränderung der Promotor DNA-Sequenz für Hydroxylasen und/oder  $\beta$ -Cyclasen kodierende Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine erhöhte Expressionsrate des Gens zur Folge hat, kann beispielsweise durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.  
10

Es ist, wie vorstehend beschrieben, möglich, die Expression der endogenen Hydroxylase und/oder  $\beta$ -Cyclase durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdstoffen erfolgen.  
15

Des Weiteren kann eine veränderte bzw. erhöhte Expression eines endogenen Hydroxylase- und/oder  $\beta$ -Cyclase-Gens dadurch erzielt werden, dass ein in der nicht transformierten Pflanze nicht vorkommendes Regulator-Protein mit dem Promotor dieses Gens in Wechselwirkung tritt.  
20

Solch ein Regulator kann ein chimäres Protein darstellen, welches aus einer DNA-Bindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne besteht, wie beispielsweise in WO 96/06166 beschrieben.  
25

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine  $\beta$ -Cyclase durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine  $\beta$ -Cyclase in die Pflanze.  
30

Dazu kann prinzipiell jedes Hydroxylase-Gen bzw. jedes  $\beta$ -Cyclase-Gen, also jede Nukleinsäure, die eine Hydroxylase und jede Nukleinsäure, die eine  $\beta$ -Cyclase kodiert, verwendet werden.  
35

Bei genomischen Hydroxylase-bzw.  $\beta$ -Cyclase-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall das die Wirtspflanze nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechende Hydroxylase bzw.  $\beta$ -Cyclase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.  
40  
45

## 19

Beispiele für ein Hydroxylase-Gene sind:

eine Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase aus *Haematococcus pluvialis*, Accession AX038729, WO 0061764); (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 17, Protein: SEQ ID NO: 18),

5

sowie Hydroxylasen der folgenden Accession Nummern:

|emb|CAB55626.1, CAA70427.1, CAA70888.1, CAB55625.1, AF499108\_1, AF315289\_1, AF296158\_1, AAC49443.1, NP\_194300.1, NP\_200070.1,  
 10 AAG10430.1, CAC06712.1, AAM88619.1, CAC95130.1, AAL80006.1, AF162276\_1, AA053295.1, AAN85601.1, CRTZ\_ERWHE, CRTZ\_PANAN, BAB79605.1, CRTZ\_ALCSP, CRTZ\_AGRAU, CAB56060.1, ZP\_00094836.1, AAC44852.1, BAC77670.1, NP\_745389.1, NP\_344225.1, NP\_849490.1, ZP\_00087019.1, NP\_503072.1, NP\_852012.1, NP\_115929.1,  
 15 ZP\_00013255.1

Eine besonders bevorzugte Hydroxylase ist weiterhin die Hydroxylase aus Tomate (Accession Y14809) (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 97; Protein: SEQ ID NO: 98).

20 Beispiele für ein  $\beta$ -Cyclase-Gene sind:

eine Nukleinsäure, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase aus Tomate (Accession X86452). (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 19, Protein: SEQ ID NO: 20),

Sowie  $\beta$ -Cyclasen der folgenden Accession Nummern:

25

S66350	lycopene beta-cyclase (EC 5.5.1.-) - tomato
CAA60119	lycopene synthase [ <i>Capsicum annuum</i> ]
S66349	lycopene beta-cyclase (EC 5.5.1.-) - common tobacco
CAA57386	lycopene cyclase [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]
30 AAM21152	lycopene beta-cyclase [ <i>Citrus sinensis</i> ]
AAD38049	lycopene cyclase [ <i>Citrus x paradisi</i> ]
AAN86060	lycopene cyclase [ <i>Citrus unshiu</i> ]
AAF44700	lycopene beta-cyclase [ <i>Citrus sinensis</i> ]
AAK07430	lycopene beta-cyclase [ <i>Adonis palaestina</i> ]
35 AAG10429	beta cyclase [ <i>Tagetes erecta</i> ]
AAA81880	lycopene cyclase
AAB53337	Lycopene beta cyclase
AAL92175	beta-lycopene cyclase [ <i>Sandersonia aurantiaca</i> ]
CAA67331	lycopene cyclase [ <i>Narcissus pseudonarcissus</i> ]
40 AAM45381	beta cyclase [ <i>Tagetes erecta</i> ]
	AA018661 lycopene beta-cyclase [ <i>Zea mays</i> ]
AAG21133	chromoplast-specific lycopene beta-cyclase [ <i>Lycopersicon esculentum</i> ]
AAF18989	lycopene beta-cyclase [ <i>Daucus carota</i> ]
45 ZP_001140	hypothetical protein [ <i>Prochlorococcus marinus</i> str. MIT9313]

## 20

- ZP\_001050 hypothetical protein [*Prochlorococcus marinus* subsp. *pastoris* str. CCMP1378]
- ZP\_001046 hypothetical protein [*Prochlorococcus marinus* subsp. *pastoris* str. CCMP1378]
- 5 ZP\_001134 hypothetical protein [*Prochlorococcus marinus* str. MIT9313]
- ZP\_001150 hypothetical protein [*Synechococcus* sp. WH 8102]
- AAF10377 lycopene cyclase [*Deinococcus radiodurans*]
- BAA29250 393aa long hypothetical protein [*Pyrococcus horikoshii*]
- 10 BAC77673 lycopene beta-monocyclase [marine bacterium P99-3]
- AAL01999 lycopene cyclase [*Xanthobacter* sp. Py2]
- ZP\_000190 hypothetical protein [*Chloroflexus aurantiacus*]
- ZP\_000941 hypothetical protein [*Novosphingobium aromaticivorans*]
- AAF78200 lycopene cyclase [*Bradyrhizobium* sp. ORS278]
- 15 BAB79602 crtY [*Pantoea agglomerans* pv. *milletiae*]
- CAA64855 lycopene cyclase [*Streptomyces griseus*]
- AAA21262 dycopene cyclase [*Pantoea agglomerans*]
- C37802 crtY protein - *Erwinia uredovora*
- BAB79602 crtY [*Pantoea agglomerans* pv. *milletiae*]
- 20 AAA64980 lycopene cyclase [*Pantoea agglomerans*]
- AAC44851 lycopene cyclase
- BAA09593 Lycopene cyclase [*Paracoccus* sp. MBIC1143]
- ZP\_000941 hypothetical protein [*Novosphingobium aromaticivorans*]
- CAB56061 lycopene beta-cyclase [*Paracoccus marcusii*]
- 25 BAA20275 lycopene cyclase [*Erythrobacter longus*]
- ZP\_000570 hypothetical protein [*Thermobifida fusca*]
- ZP\_000190 hypothetical protein [*Chloroflexus aurantiacus*]
- AAK07430 lycopene beta-cyclase [*Adonis palaestina*]
- CAA67331 lycopene cyclase [*Narcissus pseudonarcissus*]
- 30 AAB53337 Lycopene beta cyclase
- BAC77673 lycopene beta-monocyclase [marine bacterium P99-3]

Eine besonders bevorzugte b-Cyclase ist weiterhin die chromoplastenspezifische b-Cyclase aus Tomate (AAG21133) (Nukleinsäure:  
 35 SEQ ID No. 95; Protein: SEQ ID No. 96)

In den erfindungsgemäßen bevorzugten transgenen Pflanzen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres Hydroxylase-Gen und/oder  $\beta$ -Cyclase-Gen  
 40 vor.

In dieser bevorzugten Ausführungsform weist die genetisch veränderte Pflanze beispielsweise mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase oder mindestens zwei endo-  
 45 gene Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase oder

## 21

mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase auf.

- Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Hydroxylase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 18 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 18, und die die enzymatische Eigenschaft einer Hydroxylase aufweisen.
- 15 Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der
- 20 Seq ID NO: 18 leicht auffinden.

- Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 17 aus verschiedenen Organismen deren genomische
- 25 Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

- In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur
- 30 Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Hydroxylase der Sequenz SEQ ID NO: 18.

- Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rück-
- 35 übersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die
- 40 codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

- In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 17 in den Orga-
- 45 nismus ein.

## 22

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als  $\beta$ -Cyclase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 20 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion

5 von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 20, und die die enzymatische Eigenschaft einer  $\beta$ -Cyclase auf-

10 weisen.

Weitere Beispiele für  $\beta$ -Cyclasen und  $\beta$ -Cyclase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben durch Homologievergleich

15 gleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der SEQ ID NO: 20 leicht auffinden.

Weitere Beispiele für  $\beta$ -Cyclasen und  $\beta$ -Cyclase-Gene lassen sich

20 weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 19 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

25 In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der  $\beta$ -Cyclase der Sequenz SEQ ID NO: 20.

30 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend

35 der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine

40 Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 19 in den Organismus ein.

Alle vorstehend erwähnten Hydroxylase-Gene oder  $\beta$ -Cyclase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Syn-

45 these aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Syn-

## 23

these von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe  
5 des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

- 10 In einer weiter bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens weisen die Pflanzen gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität auf.

Unter  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer  $\epsilon$ -Cyclase  
15 verstanden.

Unter einer  $\epsilon$ -Cyclase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, einen endständigen, linearen Rest von Lycopin in einen  $\epsilon$ -Ionon-Ring zu überführen.

20

Unter einer  $\epsilon$ -Cyclase wird daher insbesondere ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Lycopin in  $\delta$ -Carotin umzuwandeln.

- 25 Dementsprechend wird unter  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\epsilon$ -Cyclase umgesetzte Menge Lycopin bzw. gebildete Menge  $\delta$ -Carotin verstanden.

Bei einer reduzierten  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp  
30 wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\epsilon$ -Cyclase die umgesetzte Menge Lycopin bzw. die gebildete Menge  $\delta$ -Carotin reduziert.

Unter einer reduzierten  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität wird vorzugsweise  
35 die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Funktionalität einer  $\epsilon$ -Cyclase in einer pflanzlichen Zelle, Pflanze oder einem davon abgeleiteten Teil, Gewebe, Organ, Zellen oder Samen verstanden.

40

Die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität in Pflanzen gegenüber dem Wildtyp kann beispielsweise durch Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Proteinmenge, oder der  $\epsilon$ -Cyclase-mRNA-Menge in der Pflanze erfolgen. Dementsprechend kann eine gegenüber dem Wildtyp reduzierte  $\epsilon$ -Cy-  
45 clase-Aktivität direkt bestimmt werden oder über die Bestimmung

## 24

der  $\epsilon$ -Cyclase-Proteinmenge oder der  $\epsilon$ -Cyclase-mRNA-Menge der erfindungsgemäßen Pflanze im Vergleich zum Wildtyp erfolgen.

Eine Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität umfasst eine mengenmäßige Verringerung einer  $\epsilon$ -Cyclase bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen der  $\epsilon$ -Cyclase (d.h. fehlende Nachweisbarkeit von  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit der  $\epsilon$ -Cyclase). Vorzugsweise wird die  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität (bzw. die  $\epsilon$ -Cyclase-Proteinmenge oder die  $\epsilon$ -Cyclase-mRNA-Menge) in der Pflanze, besonders bevorzugt in Blüten im Vergleich zum Wildtyp um mindestens 5 %, weiter bevorzugt um mindestens 20 %, weiter bevorzugt um mindestens 50 %, weiter bevorzugt um 100 % reduziert. Insbesondere meint "Reduzierung" auch das vollständige Fehlen der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität (bzw. des  $\epsilon$ -Cyclase-Proteins oder der  $\epsilon$ -Cyclase-mRNA).

Die Bestimmung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

20

Die  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität kann nach Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15) *in vitro* bestimmt werden, wenn zu einer bestimmten Menge an Pflanzenextrakt Kaliumphosphat als Puffer (pH 7.6), Lycopin als Substrat, Stromaprotein von Paprika, NADP<sup>+</sup>, NADPH und ATP zugegeben werden.

25

Die Bestimmung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt besonders bevorzugt nach Bouvier, d'Harlingue und Camara (Molecular Analysis of carotenoid cyclase inhibition; Arch. Biochem. Biophys. 346(1) (1997) 53-64):

30

Der *in-vitro* Assay wird in einem Volumen von 0.25 ml durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), unterschiedliche Mengen an Pflanzenextrakt, 20 nM Lycopin, 0.25 mg an chromoplastidärem Stromaprotein aus Paprika, 0.2 mM NADP<sup>+</sup>, 0.2 mM NADPH und 1 mM ATP. NADP/NADPH und ATP werden in 0.01 ml Ethanol mit 1 mg Tween 80 unmittelbar vor der Zugabe zum Inkubationsmedium gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 30°C wird die Reaktion durch Zugabe von Chloroform/Methanol (2:1) beendet. Die in Chloroform extrahierten Reaktionsprodukte werden mittels HPLC analysiert.

40

Ein alternativer Assay mit radioaktivem Substrat ist beschrieben in Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15). Eine weitere analytische Methode ist beschrieben in Beyer, Kröncke und Nievelstein (On the mechanism of the lycopene

45

## 25

isomerase/cyclase reaction in *Narcissus pseudonarcissus* L. chromatophore; J. Biol. Chem. 266(26) (1991) 17072-17078).

Vorzugsweise erfolgt die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität in 5 Pflanzen durch mindestens eines der nachfolgenden Verfahren:

- 10 a) Einbringen mindestens einer doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA genannt, oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten. Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA gegen ein  $\epsilon$ -Cyclase-Gen (also genomische DNA-Sequenzen wie die Promotorsequenz) oder ein  $\epsilon$ -Cyclase-Transkript (also mRNA-Sequenzen) gerichtet ist,
- 15 b) Einbringen mindestens einer  $\epsilon$ -Cyclase antisense-Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA genannt, oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette. Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA gegen ein  $\epsilon$ -Cyclase-Gen (also 20 genomische DNA-Sequenzen) oder ein  $\epsilon$ -Cyclase-Gen-Transkript (also RNA-Sequenzen) gerichtet ist. Umfasst sind auch  $\alpha$ -anomere Nukleinsäuresequenzen,
- 25 c) Einbringen mindestens einer  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA kombiniert mit einem Ribozym oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 30 d) Einbringen mindestens einer  $\epsilon$ -Cyclase sense-Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch  $\epsilon$ -Cyclase-senseRNA genannt, zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 35 e) Einbringen mindestens eines DNA- oder Protein-bindenden Faktors gegen ein  $\epsilon$ -Cyclase-Gen, -RNA oder -Protein oder einer dessen Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 40 f) Einbringen mindestens einer den  $\epsilon$ -Cyclase RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 45 g) Einbringen mindestens eines Konstruktes zur Erzeugung eines Funktionsverlustes, wie beispielsweise die Generierung von Stopp-Kodons oder eine Verschiebungen im Leseraster, an einem  $\epsilon$ -Cyclase-Gen beispielsweise durch Erzeugung einer Insertion, Deletion, Inversion oder Mutation in einem  $\epsilon$ -Cyclase-Gen. Bevorzugt können Knockout-Mutanten mittels gezielter Insertion in besagtes  $\epsilon$ -Cyclase-Gen durch homologe



## 26

Rekombination oder Einbringen von sequenzspezifischen Nukleasen gegen  $\epsilon$ -Cyclase-Gensequenzen generiert werden.

Dem Fachmann ist bekannt, dass auch weitere Verfahren im Rahmen  
5 der vorliegenden Erfindung zur Verminderung einer  $\epsilon$ -Cyclase bzw. seiner Aktivität oder Funktion eingesetzt werden können. Beispielsweise kann auch das Einbringen einer dominant-negativen Variante einer  $\epsilon$ -Cyclase oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette vorteilhaft sein. Dabei kann jedes  
10 einzelne dieser Verfahren eine Verminderung der Proteinmenge, mRNA-Menge und/oder Aktivität einer  $\epsilon$ -Cyclase bewirken. Auch eine kombinierte Anwendung ist denkbar. Weitere Methoden sind dem Fachmann bekannt und können die Behinderung oder Unterbindung der Prozessierung der  $\epsilon$ -Cyclase, des Transports der  $\epsilon$ -Cyclase oder  
15 dessen mRNA, Hemmung der Ribosomenanlagerung, Hemmung des RNA-Spleißens, Induktion eines  $\epsilon$ -Cyclase-RNA abbauenden Enzyms und/oder Hemmung der Translationselongation oder -termination umfassen.

20 Die einzelnen bevorzugten Verfahren seien infolge durch beispielhafte Ausführungsformen beschrieben:

- a) Einbringen einer doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenz ( $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA)

25

Das Verfahren der Genregulation mittels doppelsträngiger RNA ("double-stranded RNA interference"; dsRNAi) ist bekannt und beispielsweise in Matzke MA et al. (2000) Plant Mol Biol 43:401-415; Fire A. et al (1998) Nature 391:806-811; WO 99/32619;  
30 WO 99/53050; WO 00/68374; WO 00/44914; WO 00/44895; WO 00/49035 oder WO 00/63364 beschrieben. Auf die in den angegebenen Zitaten beschriebenen Verfahren und Methoden wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen.

35 Unter "Doppelsträngiger Ribonukleinsäuresequenz" wird erfindungsgemäß eine oder mehr Ribonukleinsäuresequenzen, die aufgrund komplementärer Sequenzen theoretisch, beispielsweise gemäß den Basenpaarregeln von Watson und Crick und/oder faktisch, beispielsweise aufgrund von Hybridisierungsexperimenten, in vitro  
40 und/oder in vivo in der Lage sind, doppelsträngige RNA-Strukturen auszubilden.

Dem Fachmann ist bewusst, dass die Ausbildung von doppelsträngigen RNA-Strukturen, einen Gleichgewichtszustand darstellt.  
45 Bevorzugt ist das Verhältnis von doppelsträngigen Molekülen zu

## 27

entsprechenden dissoziierten Formen mindestens 1 zu 10, bevorzugt 1:1, besonders bevorzugt 5:1, am meisten bevorzugt 10:1.

Unter einer doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenz  
5 oder auch  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA wird vorzugsweise ein RNA-Molekül  
verstanden, das einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist  
und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

10 a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-  
Transkripts identisch ist und/oder

b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-  
Promotor-Sequenz identisch ist.

Im erfindungsgemäßen Verfahren bringt man daher zur Reduzierung  
15 der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität bevorzugt in die Pflanze eine RNA ein, die  
einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem  
Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

20 a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-  
Transkripts identisch ist und/oder

b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-  
Promotor-Sequenz identisch ist.

25 Unter dem Begriff " $\epsilon$ -Cyclase-Transkript" wird der transkripierte  
Teil eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens verstanden, der neben der  $\epsilon$ -Cyclase ko-  
dierenden Sequenz beispielsweise auch nichtkodierende Sequenzen,  
wie beispielsweise auch UTRs enthält.

30 Unter einer RNA, die "mit mindestens einem Teil der Pflanze eige-  
nen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist", ist vorzugsweise  
gemeint, dass die RNA-Sequenz mit mindestens einem Teil des theo-  
retischen Transkriptes der  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz, also der  
entsprechenden RNA-Sequenz, identisch ist.

35

Unter "einem Teil" des Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Transkripts bzw.  
der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz werden Teil-  
sequenzen verstanden, die von wenigen Basenpaaren bis hin zu  
vollständigen Sequenzen des Transkripts bzw. der Promotorsequenz  
40 reichen können. Die optimale Länger der Teilsequenzen kann der  
Fachmann durch Routineversuche leicht ermitteln.

## 28

In der Regel beträgt die Länge der Teilsequenzen mindestens 10 Basen und höchstens 2 kb, bevorzugt mindestens 25 Basen und höchstens 1,5 kb, besonders bevorzugt mindestens 50 Basen und höchstens 600 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens 100 Basen und höchstens 500, am meisten bevorzugt mindestens 200 Basen oder mindestens 300 Basen und höchstens 400 Basen.

Vorzugsweise werden die Teilsequenzen so ausgesucht, dass eine möglichst hohe Spezifität erreicht wird und nicht Aktivitäten anderer Enzyme reduziert werden, deren Verminderung nicht erwünscht ist. Es ist daher vorteilhaft für die Teilsequenzen der  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA Teile des  $\epsilon$ -Cyclase Transkripts und/oder Teilsequenzen der  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenzen zu wählen, die nicht in anderen Aktivitäten auftreten.

15

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält daher die  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA eine Sequenz, die mit einem Teil der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Transkripts identisch ist und das 5'-Ende oder das 3'-Ende der Pflanze eigenen Nukleinsäure, kodierend eine  $\epsilon$ -Cyclase enthält. Insbesondere sind nichttranslatierte Bereiche im 5' oder 3' des Transkriptes geeignet, selektive Doppel-Strang-Strukturen herzustellen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung bezieht sich auf doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA-Moleküle), die bei Einbringen in einen pflanzlichen Organismus (oder eine davon abgeleitete Zelle, Gewebe, Organ oder Vermehrungsmaterial) die Verminderung einer  $\epsilon$ -Cyclase bewirken.

Ein doppelsträngige RNA-Molekül zur Reduzierung der Expression einer  $\epsilon$ -Cyclase ( $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA) umfasst dabei bevorzugt

- a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil eines "sense"-RNA- $\epsilon$ -Cyclase Transkriptes, und
- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen, bevorzugt vollständig, komplementären ist.

Zur Transformation der Pflanze mit einer  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA wird bevorzugt ein Nukleinsäurekonstrukt verwendet, das in die Pflanze eingebracht wird und das in der Pflanze in die  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA transkribiert wird.

## 29

Daher betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Nukleinsäurekonstrukt, transkribierbar in

- 5 a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA- $\epsilon$ -Cyclase Transkriptes, und
- 10 b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementär ist.

Diese Nukleinsäurekonstrukte werden im folgenden auch Expressionskassetten oder Expressionsvektoren genannt.

15

In Bezug auf die dsRNA-Moleküle wird unter  $\epsilon$ -Cyclase-Nukleinsäuresequenz, bzw. das entsprechende Transkript bevorzugt die Sequenz gemäß SEQ ID NO: 38 oder ein Teil derselben verstanden.

- 20 "Im wesentlichen identisch" meint, dass die dsRNA Sequenz auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu der  $\epsilon$ -Cyclase Zielsequenz aufweisen kann und dennoch eine effizient Verminderung der Expression bewirkt. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 75 %, bevorzugt mindestens 80 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 90 % am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "sense"-Strang einer inhibitorischen dsRNA und mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens, bzw. zwischen dem "antisense"-Strang dem komplementären Strang eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens.

30

- Eine 100%ige Sequenzidentität zwischen dsRNA und einem  $\epsilon$ -Cyclase Gentranskript ist nicht zwingend erforderlich, um eine effiziente Verminderung der  $\epsilon$ -Cyclase Expression zu bewirken. Demzufolge besteht der Vorteil, dass das Verfahren tolerant ist gegenüber Sequenzabweichungen, wie sie infolge genetischer Mutationen, Polymorphismen oder evolutionärer Divergenzen vorliegen können. So ist es beispielsweise möglich mit der dsRNA, die ausgehend von der  $\epsilon$ -Cyclase Sequenz des einen Organismus generiert wurde, die  $\epsilon$ -Cyclase Expression in einem anderen Organismus zu unterdrücken.
- 35
- 40 Zu diesem Zweck umfasst die dsRNA bevorzugt Sequenzbereiche von  $\epsilon$ -Cyclase-Gentranskripten, die konservierten Bereichen entsprechen. Besagte konservierte Bereiche können aus Sequenzvergleichen leicht abgeleitet werden.

- 45 Alternativ, kann eine "im wesentlichen identische" dsRNA auch als Nukleinsäuresequenz definiert werden, die befähigt ist, mit einem Teil eines  $\epsilon$ -Cyclase Gentranskriptes zu hybridisieren (z.B. in

## 30

400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6,4, 1 mM EDTA bei 50°C oder 70°C für 12 bis 16 h).

"Im wesentlichen komplementär" meint, dass der "antisense"-RNA-Strang auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges aufweisen kann. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 80 %, bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 95 %, am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "antisense"-RNA-Strang und dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges.

In einer weiteren Ausführungsform umfasst die  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA

- a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes des Promotorbereichs eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens, und
- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementär ist.

Das entsprechende, bevorzugt zur Transformation der Pflanzen zu verwendende, Nukleinsäurekonstrukt, umfasst

- a) einen "sense"-DNA-Strang der im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des Promotorbereichs eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens, und
- b) einen "antisense"-DNA-Strang, der zu dem DNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementär ist.

Vorzugsweise wird unter dem Promotorbereich einer  $\epsilon$ -Cyclase eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 47 oder ein Teil der selben verstanden.

Zur Herstellung der  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen zur Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität werden, insbesondere für *Tagetes erecta*, besonders bevorzugt die folgenden Teil-Sequenzen verwendet:

SEQ ID NO: 40: Sense-Fragment der 5'terminalen Region der  $\epsilon$ -Cyclase

SEQ ID NO: 41: Antisense-Fragment der 5'terminalen Region der  $\epsilon$ -Cyclase

## 31

SEQ ID NO: 42: Sense-Fragment der 3'terminalen Region der  $\epsilon$ -Cyclase

SEQ ID NO: 43: Antisense-Fragment der 3'terminalen Region der  $\epsilon$ -Cyclase

SEQ ID NO: 47: Sense-Fragment des  $\epsilon$ -Cyclase-Promotors

SEQ ID NO: 48: Antisense-Fragment des  $\epsilon$ -Cyclase-Promotors

10

Die dsRNA kann aus einem oder mehr Strängen von Polyribonukleotiden bestehen. Natürlich können, um den gleichen Zweck zu erreichen, auch mehrere individuelle dsRNA Moleküle, die jeweils einen der oben definierten Ribonukleotidsequenzabschnitte umfassen, in die Zelle oder den Organismus eingebracht werden.

15

Die doppelsträngige dsRNA-Struktur kann ausgehend von zwei komplementären, separaten RNA-Strängen oder – bevorzugt – ausgehend von einem einzelnen, selbstkomplementären RNA-Strang gebildet werden. In diesem Fall sind "sense"-RNA-Strang und "antisense"-RNA-Strang bevorzugt kovalent in Form eines invertierten "Repeats" miteinander verbunden.

20

Wie z.B. in WO 99/53050 beschrieben, kann die dsRNA auch eine Haarnadelstruktur umfassen, indem "sense"- und "antisense"-Strang durch eine verbindende Sequenz ("Linker"; beispielsweise ein Intron) verbunden werden. Die selbstkomplementären dsRNA-Strukturen sind bevorzugt, da sie lediglich die Expression einer RNA-Sequenz erfordern und die komplementären RNA-Stränge stets in einem äquimolaren Verhältnis umfassen. Bevorzugt ist die verbindende Sequenz ein Intron (z.B. ein Intron des ST-LS1 Gens aus Kartoffel; Vancanneyt GF et al. (1990) Mol Gen Genet 220(2):245-250).

30

Die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine dsRNA kann weitere Elemente beinhalten, wie beispielsweise Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungssignale.

35

Ist die dsRNA jedoch gegen die Promotorsequenz einer  $\epsilon$ -Cyclase gerichtet, so umfasst sie bevorzugt keine Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungssignale. Dies ermöglicht eine Retention der dsRNA im Nukleus der Zelle und verhindert eine Verteilung der dsRNA in der gesamten Pflanze "Spreading").

40

## 32

Sollen die zwei Stränge der dsRNA in einer Zelle oder Pflanze zusammengebracht werden, so kann dies beispielhaft auf folgende Art geschehen:

- 5 a) Transformation der Zelle oder Pflanze mit einem Vektor, der beide Expressionskassetten umfasst,
- b) Kotransformation der Zelle oder Pflanze mit zwei Vektoren, wobei der eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, der andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.
- 10 c) Kreuzung von zwei individuellen Pflanzenlinien, wobei die eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, die andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.
- 15

Die Bildung der RNA Duplex kann entweder außerhalb der Zelle oder innerhalb derselben initiiert werden.

20

Die dsRNA kann entweder in vivo oder in vitro synthetisiert werden. Dazu kann eine DNA-Sequenz kodierend für eine dsRNA in eine Expressionskassette unter Kontrolle mindestens eines genetischen Kontrollelementes (wie beispielsweise einem Promotor) gebracht werden. Eine Polyadenylierung ist nicht erforderlich, ebenso müssen keine Elemente zur Initiierung einer Translation vorhanden sein. Bevorzugt ist die Expressionskassette für die MP-dsRNA auf dem Transformationskonstrukt oder dem Transformationsvektor enthalten.

30

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Expression der dsRNA ausgehend von einem Expressionskonstrukt unter funktioneller Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors, besonders bevorzugt unter der Kontrolle des Promotors beschrieben durch SEQ ID NO: 28 oder eines funktionell äquivalenten Teils desselben.

Die Expressionskassetten kodierend für den "antisense"- und/oder den "sense"-Strang einer  $\epsilon$ -Cyclase -dsRNA oder für den selbstkomplementären-Strang der dsRNA, werden dazu bevorzugt in einen Transformationsvektor insertiert und mit den unten beschriebenen Verfahren in die pflanzliche Zelle eingebracht. Für das erfindungsgemäße Verfahren ist eine stabile Insertion in das Genom vorteilhaft.

45

Die dsRNA kann in einer Menge eingeführt werden, die zumindest eine Kopie pro Zelle ermöglicht. Höhere Mengen (z.B. mindestens 5, 10, 100, 500 oder 1000 Kopien pro Zelle) können ggf. eine effizienter Verminderung bewirken.

5

- b) Einbringen einer antisense-Ribonukleinsäuresequenz einer  $\epsilon$ -Cyclase ( $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA)

- Verfahren zur Verminderung eines bestimmten Proteins durch die "antisense"-Technologie sind vielfach - auch in Pflanzen - beschrieben (Sheehy et al. (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85: 8805-8809; US 4,801,340; Mol JN et al. (1990) FEBS Lett 268(2):427-430). Das antisense Nukleinsäuremolekül hybridisiert bzw. bindet mit der zellulären mRNA und/oder genomischen DNA
- 10 kodierend für das zu vermindernende  $\epsilon$ -Cyclase. Dadurch wird die Transkription und/oder Translation der  $\epsilon$ -Cyclase unterdrückt. Die Hybridisierung kann auf konventionelle Art über die Bildung einer stabilen Duplex oder - im Fall von genomischer DNA - durch Bindung des antisense Nukleinsäuremoleküls mit der Duplex der
- 15 genomischen DNA durch spezifische Wechselwirkung in der großen Furche der DNA-Helix entstehen.

- Eine  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA kann unter Verwendung der für diese  $\epsilon$ -Cyclase kodierenden Nukleinsäuresequenz, beispielsweise
- 25 der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 38 nach den Basenpaarregeln von Watson und Crick abgeleitet werden. Die  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA kann zu der gesamten transkribierten mRNA der  $\epsilon$ -Cyclase komplementär sein, sich auf die kodierende Region beschränken oder nur aus einem Oligonukleotid bestehen, das zu einem Teil der
- 30 kodierenden oder nicht-kodierenden Sequenz der mRNA komplementär ist. So kann das Oligonukleotid beispielsweise komplementär zu der Region sein, die den Translationsstart für die  $\epsilon$ -Cyclase umfasst. Die  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA kann eine Länge von zum Beispiel 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 Nukleotide haben, kann
- 35 aber auch länger sein und mindestens 100, 200, 500, 1000, 2000 oder 5000 Nukleotide umfassen.  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNAs werden im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens bevorzugt rekombinant in der Zielzelle exprimiert..

- 40 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft transgene Expressionskassetten enthaltend eine Nukleinsäuresequenz kodierend für zumindest einen Teil einer  $\epsilon$ -Cyclase, wobei besagte Nukleinsäuresequenz mit einem in pflanzlichen Organismen funktionellen Promotor in antisense-Orientierung funktionell verknüpft ist. In einer
- 45 besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Expression der antisenseRNA ausgehend von einem Expressionskonstrukt unter funktioneller Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors, besonders



bevorzugt unter der Kontrolle des Promotors beschrieben durch SEQ ID NO: 28 oder eines funktionell äquivalenten Teils desselben.

Besagte Expressionskassetten können Teil eines Transformations-  
5 konstrukt oder Transformationsvektors sein, oder aber auch im Rahmen einer Kotransformation eingeführt werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann die Expression einer  $\epsilon$ -Cyclase durch Nukleotidsequenzen inhibiert werden, die  
10 komplementär zu der regulatorischen Region eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens (z.B. einem  $\epsilon$ -Cyclase Promoter und/oder Enhancer) sind und triple-helikale Strukturen mit der dortigen DNA-Doppelhelix ausbilden, so dass die Transkription des  $\epsilon$ -Cyclase-Gens reduziert wird. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (Helene C (1991) Anticancer  
15 Drug Res 6(6):569-84; Helene C et al. (1992) Ann NY Acad Sci 660:27-36; Maher LJ (1992) Bioassays 14(12):807- 815).

In einer weiteren Ausführungsform kann die  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA eine  $\alpha$ -anomere Nukleinsäure sein. Derartige  $\alpha$ -anomere Nukleinsäuremoleküle bilden spezifische doppelsträngige Hybride mit  
20 komplementärer RNA in denen, - im Unterschied zu den konventionellen  $\beta$ -Nukleinsäuren - die beiden Stränge parallel zueinander verlaufen (Gautier C et al. (1987) Nucleic Acids Res 15:6625-6641).

25

c) Einbringen einer  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA kombiniert mit einem Ribozym

Vorteilhaft kann die oben beschriebene antisense-Strategie mit  
30 einem Ribozym-Verfahren gekoppelt werden. Katalytische RNA-Moleküle oder Ribozyme können an jede beliebige Ziel-RNA angepasst werden und spalten das Phosphodiester-Gerüst an spezifischen Positionen, wodurch die Ziel-RNA funktionell deaktiviert wird (Tanner NK (1999) FEMS Microbiol Rev 23(3):257-275). Das Ribozym  
35 wird dadurch nicht selber modifiziert, sondern ist in der Lage, weitere Ziel-RNA-Moleküle analog zu spalten, wodurch es die Eigenschaften eines Enzyms erhält. Der Einbau von Ribozymsequenzen in "antisense"-RNAs verleiht eben diesen "antisense"-RNAs diese enzymähnliche, RNA-spaltende Eigenschaft und steigert so deren  
40 Effizienz bei der Inaktivierung der Ziel-RNA. Die Herstellung und Verwendung entsprechender Ribozym-"antisense"-RNA-Moleküle ist beschrieben (u.a. bei Haseloff et al. (1988) Nature 334: 585-591); Haselhoff und Gerlach (1988) Nature 334:585-591; Steinecke P et al. (1992) EMBO J 11(4):1525-1530; de Feyter R  
45 et al. (1996) Mol Gen Genet. 250(3):329-338).

- Auf diese Art können Ribozyme (z.B. "Hammerhead"-Ribozyme; Haselhoff und Gerlach (1988) Nature 334:585-591) verwendet werden, um die mRNA eines zu vermindernenden  $\epsilon$ -Cyclases katalytisch zu spalten und so die Translation zu verhindern. Die Ribozym-Technologie
- 5 kann die Effizienz einer antisense-Strategie erhöhen. Verfahren zur Expression von Ribozymen zur Verminderung bestimmter Proteine sind beschrieben in (EP 0 291 533, EP 0 321 201, EP 0 360 257). In pflanzlichen Zellen ist eine Ribozym-Expression ebenfalls beschrieben (Steinecke P et al. (1992) EMBO J 11(4):1525-1530; de
- 10 Feyter R et al. (1996) Mol Gen Genet. 250(3):329-338). Geeignete Zielsequenzen und Ribozyme können zum Beispiel wie bei "Steinecke P, Ribozymes, Methods in Cell Biology 50, Galbraith et al. eds, Academic Press, Inc. (1995), S. 449-460" beschrieben, durch Sekundärstrukturberechnungen von Ribozym- und Ziel-RNA sowie durch
- 15 deren Interaktion bestimmt werden (Bayley CC et al. (1992) Plant Mol Biol. 18(2):353-361; Lloyd AM and Davis RW et al. (1994) Mol Gen Genet. 242(6):653-657). Beispielsweise können Derivate der Tetrahymena L-19 IVS RNA konstruiert werden, die komplementäre Bereiche zu der mRNA des zu supprimierenden  $\epsilon$ -Cyclases aufweisen
- 20 (siehe auch US 4,987,071 und US 5,116,742). Alternativ können solche Ribozyme auch über einen Selektionsprozess aus einer Bibliothek diverser Ribozyme identifiziert werden (Bartel D und Szostak JW (1993) Science 261:1411-1418).
- 25 d) Einbringen einer sense-Ribonukleinsäuresequenz einer  $\epsilon$ -Cyclase ( $\epsilon$ -Cyclase-senseRNA) zur Induktion einer Kosuppression

- Die Expression einer  $\epsilon$ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz (oder eines Teils derselben) in sense-Orientierung kann zu einer Kosup-
- 30 pression des entsprechenden  $\epsilon$ -Cyclase-Gens führen. Die Expression von sense-RNA mit Homologie zu einem endogenen  $\epsilon$ -Cyclasegen kann die Expression desselben vermindern oder ausschalten, ähnlich wie es für antisense Ansätze beschrieben wurde (Jorgensen et al. (1996) Plant Mol Biol 31(5):957-973; Goring et al. (1991) Proc
- 35 Natl Acad Sci USA 88:1770-1774; Smith et al. (1990) Mol Gen Genet 224:447-481; Napoli et al. (1990) Plant Cell 2:279-289; Van der Krol et al. (1990) Plant Cell 2:291-99). Dabei kann das eingeführte Konstrukt das zu vermindernde, homologe Gen ganz oder nur teilweise repräsentieren. Die Möglichkeit zur Translation ist
- 40 nicht erforderlich. Die Anwendung dieser Technologie auf Pflanzen ist beschrieben (z.B. Napoli et al. (1990) Plant Cell 2:279-289; in US 5,034,323.

- Bevorzugt wird die Kosuppression unter Verwendung einer Sequenz
- 45 realisiert, die im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil der Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  $\epsilon$ -Cyclase, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 38.

## 36

Bevorzugt ist die  $\epsilon$ -Cyclase-senseRNA so gewählt, dass es nicht zu einer Translation der  $\epsilon$ -Cyclase oder eines Teils desselben kommen kann. Dazu kann beispielsweise der 5'-untranslatierte oder 3'-untranslatierte Bereich gewählt oder aber das ATG-Startkodon deletiert oder mutiert werden.

e) Einbringen von DNA-oder Protein-bindende Faktoren gegen  $\epsilon$ -Cyclase Gene, -RNAs oder Proteine

- 10 Eine Verminderung einer  $\epsilon$ -Cyclase Expression ist auch mit spezifischen DNA-bindenden Faktoren z.B. mit Faktoren vom Typ der Zinkfingertranskriptionsfaktoren möglich. Diese Faktoren lagern sich an die genomische Sequenz des endogenen Zielgens, bevorzugt in den regulatorischen Bereichen, an und bewirken eine Verminderung der Expression. Entsprechende Verfahren zur Herstellung entsprechender Faktoren sind beschrieben (Dreier B et al. (2001) J Biol Chem 276(31):29466-78; Dreier B et al. (2000) J Mol Biol 303(4):489-502; Beerli RR et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97 (4):1495-1500; Beerli RR et al. (2000) J Biol Chem 20 275(42):32617-32627; Segal DJ and Barbas CF 3rd. (2000) Curr Opin Chem Biol 4(1):34-39; Kang JS and Kim JS (2000) J Biol Chem 275(12):8742-8748; Beerli RR et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(25):14628-14633; Kim JS et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(8):3616-3620; Klug A (1999) J Mol Biol 293(2):215-218; Tsai 25 SY et al. (1998) Adv Drug Deliv Rev 30(1-3):23-31; Mapp AK et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97(8):3930-3935; Sharrocks AD et al. (1997) Int J Biochem Cell Biol 29(12):1371-1387; Zhang L et al. (2000) J Biol Chem 275(43):33850-33860).
- 30 Die Selektion dieser Faktoren kann unter Verwendung eines beliebigen Stückes eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens erfolgen. Bevorzugt liegt dieser Abschnitt im Bereich der Promotorregion. Für eine Genunterdrückung kann er aber auch im Bereich der kodierenden Exons oder Introns liegen.

## 35

- Ferner können Faktoren in eine Zelle eingebracht werden, die die  $\epsilon$ -Cyclase selber inhibieren. Diese proteinbindenden Faktoren können z.B. Aptamere (Famulok M und Mayer G (1999) Curr Top Microbiol Immunol 243:123-36) oder Antikörper bzw. Antikörperfragmente 40 oder einzelkettige Antikörper sein. Die Gewinnung dieser Faktoren ist beschrieben (Owen M et al. (1992) Biotechnology (N Y) 10(7):790-794; Franken E et al. (1997) Curr Opin Biotechnol 8(4):411-416; Whitelam (1996) Trend Plant Sci 1:286-272).

## 37

- f) Einbringen von den  $\epsilon$ -Cyclase RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenzen und Expressionskonstrukten

Die  $\epsilon$ -Cyclase Expression kann effektiv auch durch Induktion des  
5 spezifischen  $\epsilon$ -Cyclase RNA-Abbaus durch die Pflanze mit Hilfe  
eines viralen Expressionssystems (Amplikon; Angell SM et al.  
(1999) Plant J 20(3):357-362) realisiert werden. Diese Systeme -  
auch als "VIGS" (viral induced gene silencing) bezeichnet - brin-  
gen Nukleinsäuresequenzen mit Homologie zu dem Transkript einer  
10 zu vermindernenden  $\epsilon$ -Cyclase mittels viraler Vektoren in die  
Pflanze ein. Die Transkription wird sodann - vermutlich mediiert  
durch pflanzliche Abwehrmechanismen gegen Viren - abgeschaltet.  
Entsprechende Techniken und Verfahren sind beschrieben (Ratcliff  
F et al. (2001) Plant J 25(2):237-45; Fagard M und Vaucheret H  
15 (2000) Plant Mol Biol 43(2-3):285-93; Anandalakshmi R et al.  
(1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(22):13079-84; Ruiz MT (1998)  
Plant Cell 10(6):937-46).

Bevorzugt wird die VIGS-vermittelte Verminderung unter Ver-  
20 wendung einer Sequenz realisiert, die im wesentlichen identisch  
ist zu zumindest einem Teil der Nukleinsäuresequenz kodierend  
für ein  $\epsilon$ -Cyclase, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß  
SEQ ID NO: 38.

- 25 g) Einbringen von Konstrukten zur Erzeugung eines Funktions-  
verlustes oder einer Funktionsminderung an  $\epsilon$ -Cyclase-Genen

Dem Fachmann sind zahlreiche Verfahren bekannt, wie genomische  
Sequenzen gezielt modifiziert werden können. Dazu zählen ins-  
30 besondere Verfahren wie die Erzeugung von Knockout-Mutanten  
mittels gezielter homologen Rekombination z.B. durch Generierung  
von Stopp-Kodons, Verschiebungen im Leseraster etc. (Hohn B und  
Puchta H (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96:8321-8323) oder die  
gezielte Deletion oder Inversion von Sequenzen mittels z.B.  
35 sequenzspezifischer Rekombinasen oder Nukleasen (s.u.)

Die Verminderung der  $\epsilon$ -Cyclase-Menge, -Funktion und/oder  
-Aktivität kann auch durch eine gezielte Insertion von Nuklein-  
säuresequenzen (z.B. der im Rahmen der erfindungsgemäßen Ver-  
40 fahrens zu insertierenden Nukleinsäuresequenz) in die Sequenz  
kodierend für eine  $\epsilon$ -Cyclase (z.B. mittels intermolekularer homo-  
loger Rekombination) realisiert werden. Im Rahmen dieser Aus-  
führungsform verwendet man bevorzugt ein DNA-Konstrukt, das zu-  
mindest einen Teil der Sequenz eines  $\epsilon$ -Cyclasegens oder benachbar-  
45 ter Sequenzen umfasst, und so mit diesen in der Zielzelle gezielt  
rekombinieren kann, so dass durch eine Deletion, Addition oder  
Substitution mindestens eines Nukleotids das  $\epsilon$ -Cyclase-Gen so ver-

- ändert wird, dass die Funktionalität des  $\epsilon$ -Cyclase-Gens reduziert oder gänzlich aufgehoben wird. Die Veränderung kann auch die regulativen Elemente (z.B. den Promotor) des  $\epsilon$ -Cyclase-Gens betreffen, so dass die kodierende Sequenz unverändert bleibt, eine Expression (Transkription und/oder Translation) jedoch unterbleibt und reduziert wird. Bei der konventionellen homologen Rekombination ist die zu insertierende Sequenz an ihrem 5'- und/oder 3'-Ende von weiteren Nukleinsäuresequenzen (A' bzw. B') flankiert, die eine ausreichende Länge und Homologie zu entsprechenden Sequenzen des  $\epsilon$ -Cyclase-Gens (A bzw. B) für die Ermöglichung der homologen Rekombination aufweisen. Die Länge liegt in der Regel in einem Bereich von mehreren hundert Basen bis zu mehreren Kilobasen (Thomas KR und Capecchi MR (1987) Cell 51:503; Strepp et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(8):4368-4373). Für die homologe Rekombination wird die pflanzliche Zelle mit dem Rekombinationskonstrukt unter Verwendung der unten beschriebenen Verfahren transformiert und erfolgreich rekombinierte Klone basierend auf der infolge inaktivierten  $\epsilon$ -Cyclase selektioniert.
- 20 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Effizienz der Rekombination gesteigert durch Kombination mit Verfahren, die die homologe Rekombination fördern. Solche Verfahren sind beschrieben und umfassen beispielhaft die Expression von Proteinen wie RecA oder die Behandlung mit PARP-Inhibitoren. Es konnte gezeigt werden, dass die intrachromosomale homologe Rekombination in Tabakpflanzen durch die Verwendung von PARP-Inhibitoren erhöht werden kann (Puchta H et al. (1995) Plant J 7:203-210). Durch den Einsatz dieser Inhibitoren kann die Rate der homologen Rekombination in den Rekombinationskonstrukten nach Induktion des sequenzspezifischen DNA-Doppelstrangbruches und damit die Effizienz der Deletion der Transgensequenzen weiter erhöht werden. Verschiedene PARP Inhibitoren können dabei zum Einsatz kommen. Bevorzugt umfasst sind Inhibitoren wie 3-Aminobenzamid, 8-Hydroxy-2-methylquinazolin-4-on (NU1025), 1,11b-Dihydro-[2H]benzopyrano-[4,3,2-de]isoquinolin-3-on (GPI 6150), 5-Aminoisoquinolinon, 3,4-Dihydro-5-[4-(1-piperidinyloxy)]-1(2H)-isoquinolinon oder die in WO 00/26192, WO 00/29384, WO 00/32579, WO 00/64878, WO 00/68206, WO 00/67734, WO 01/23386 und WO 01/23390 beschriebenen Substanzen.
- 40 Weitere geeignete Methoden sind die Einführung von Nonsense-Mutationen in endogene Markerprotein Gene zum Beispiel mittels Einführung von RNA/DNA-Oligonukleotiden in die Pflanze (Zhu et al. (2000) Nat Biotechnol 18(5):555-558) oder die Generierung von Knockout-Mutanten mit Hilfe von z.B. T-DNA-Mutagenese (Koncz et al., Plant Mol. Biol. 1992, 20(5):963-976). Punktmutationen können auch mittels DNA-RNA Hybriden erzeugt werden, die auch als

"chimeraplasty" bekannt sind (Cole-Strauss et al. (1999) Nucl Acids Res 27(5):1323-1330; Kmiec (1999) Gene therapy American Scientist 87(3):240-247).

- 5 Die Methoden der dsRNAi, der Kosuppression mittels sense-RNA und der "VIGS" ("virus induced gene silencing") werden auch als "post-transcriptional gene silencing" (PTGS) oder transcriptional gene silencing" (TGS) bezeichnet. PTGS/TGS-Verfahren sind besonders vorteilhaft, weil die Anforderungen an die Homologie zwischen dem zu vermindernenden Markerprotein-Gen und der transgen exprimierten sense- oder dsRNA-Nukleinsäuresequenz geringer sind als beispielsweise bei einem klassischen antisense-Ansatz. So kann man unter Verwendung der Markerprotein-Nukleinsäuresequenzen aus einer Art auch die Expression von homologen Markerprotein-
- 10 Proteinen in anderen Arten effektiv vermindern, ohne, dass die Isolierung und Strukturaufklärung der dort vorkommenden Markerprotein-Homologen zwingend erforderlich wäre. Dies erleichtert erheblich den Arbeitsaufwand.
- 15 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch:
- a) Einbringen mindestens einer doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen und/oder
- 25 b) Einbringen mindestens einer  $\epsilon$ -Cyclase antisense-Ribonukleinsäuresequenzen oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette in Pflanzen.
- 30

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch Einbringen mindestens einer doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen.

35

In einer bevorzugten Ausführungsform werden genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Blüten die geringste Expressionsrate einer  $\epsilon$ -Cyclase aufweisen.

40

Dies wird bevorzugt dadurch erreicht, dass die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität blütenspezifisch, besonders bevorzugt blütenblattspezifisch erfolgt.

## 40

In der vorstehend beschriebenen, besonders bevorzugten Ausführungsform wird dies dadurch erreicht, dass die Transkription der  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen unter Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors oder noch bevorzugter unter Kontrolle eines blütenblattspezifischen Promotors erfolgt.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform werden Pflanzen kultiviert, die zusätzlich gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Phytoen-Synthase-Aktivität, Phytoen-Desaturase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität aufweisen.

Unter HMG-CoA-Reduktase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer HMG-CoA-Reduktase (3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym-A-Reduktase) verstanden.

Unter einer HMG-CoA-Reduktase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym-A in Mevalonat umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter HMG-CoA-Reduktase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein HMG-CoA-Reduktase umgesetzte Menge 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym-A bzw. gebildete Menge Mevalonat verstanden.

Bei einer erhöhten HMG-CoA-Reduktase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein HMG-CoA-Reduktase die umgesetzte Menge 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym-A bzw. die gebildete Menge Mevalonat erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität des Wildtyps. Unter HMG-CoA-Reduktase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer HMG-CoA-Reduktase verstanden.

## 41

Die Bestimmung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

- 5 Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung  
10 der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.1% (v/v) Triton X-100, 2 mM  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure, 10% Glycerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0.5 mM  
15 PMSF zugegeben.

- Die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase kann nach veröffentlichten Beschreibungen gemessen werden (z.B. Schaller, Grausem, Benveniste, Chye, Tan, Song und Chua, Plant Physiol. 109 (1995), 761-770;  
20 Chappell, Wolf, Proulx, Cuellar und Saunders, Plant Physiol. 109 (1995) 1337-1343). Pflanzengewebe kann in kaltem Puffer (100 mM Kaliumphosphat (pH 7.0), 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT) homogenisiert und extrahiert werden. Das Homogenisat wird 15 Minuten lang bei 10.000g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird danach bei  
25 100.000g für 45-60 Minuten nochmals zentrifugiert. Die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase wird im Überstand und im Pellet der mikrosomalen Fraktion (nach dem Resuspendieren in 100 mM Kaliumphosphat (pH 7.0) und 50 mM DTT) bestimmt. Aliquots der Lösung und der Suspension (der Proteingehalt der Suspension entspricht  
30 etwa 1-10 µg) werden in 100 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,0 mit 3 mM NADPH und 20 µM (<sup>14</sup>C)HMG-CoA (58 µCi/µM) idealerweise in einem Volumen von 26 µl für 15-60 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wird terminiert durch die Zugabe von 5 µl Mevalonatlacton (1 mg/ml) und 6 N HCl. Nach Zugabe wird die Mischung bei  
35 Raumtemperatur 15 Minuten inkubiert. Das in der Reaktion gebildete (<sup>14</sup>C)-Mevalonat wird quantifiziert, indem 125 µl einer gesättigten Kaliumphosphat-Lösung (pH 6.0) und 300 µl Ethylacetat zugegeben werden. Die Mischung wird gut vermischt und zentrifugiert. Mittels Szintillationsmessung kann die Radioaktivität be-  
40 stimmt werden.

- Unter (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität, auch lytB oder IspH bezeichnet, wird die Enzymaktivität einer (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase  
45 verstanden.



## 42

Unter einer (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat in Isopentenylidiphosphat und Dimethylallyldiphosphate umzuwandeln.

5

Dementsprechend wird unter (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase umgesetzte Menge (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat bzw. gebildete Menge Isopentenylidiphosphat und/oder Dimethylallyldiphosphat verstanden.

Bei einer erhöhten (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase -Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase die umgesetzte Menge (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat bzw. die gebildete Menge Isopentenylidiphosphat und/oder Dimethylallyldiphosphat erhöht.

20

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase -Aktivität des Wildtyps.

Die Bestimmung der (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM ε-Aminocaprinsäure, 10 % Glycerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0,5 mM PMSF zugegeben.

45

## 43

Die Bestimmung der (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität kann über einen immunologischen Nachweis erbracht werden. Die Herstellung spezifischer Antikörper ist durch Rohdich und Kollegen (Rohdich, Hecht, Gärtner, Adam, Krieger, 5 Amslinger, Arigoni, Bacher und Eisenreich: Studies on the non-mevalonate terpene biosynthetic pathway: metabolic role of IspH (LytB) protein, Natl. Acad. Natl. Sci. USA 99 (2002), 1158-1163) beschrieben worden. Zur Bestimmung der katalytischen Aktivität beschreiben Altincicek und Kollegen (Altincicek, Duin, Reichen- 10 berg, Hedderich, Kollas, Hintz, Wagner, Wiesner, Beck und Jomaa: LytB protein catalyzes the terminal step of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis; FEBS Letters 532 (2002,) 437-440) ein in vitro-System, welches die Reduktion von (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl diphosphat in 15 die Isopentenylidiphosphat und Dimethylallyldiphosphat verfolgt.

Unter 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase verstanden.

20

Unter einer 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Hydroxyethyl-ThPP und Glycerinaldehyd-3-Phosphat in 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat umzuwandeln.

25

Dementsprechend wird unter 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase -Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase umgesetzte Menge Hydroxyethyl-ThPP und/oder Glycerinaldehyd-3-Phosphat bzw. gebildete 30 Menge -Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat verstanden.

Bei einer erhöhten 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase -Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein 1-Deoxy-D-Xylose- 35 5-Phosphat-Synthase die umgesetzte Menge Hydroxyethyl-ThPP und/oder Glycerinaldehyd-3-Phosphat bzw. die gebildete Menge -Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase -Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität des Wildtyps.

45

## 44

Die Bestimmung der 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

5

Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure, 10 % Glycerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0,5 mM PMSF zugegeben.

Die Reaktionslösung (50-200  $\mu$ l) für die Bestimmung der D-1-Deoxyxylulose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität (DXS) besteht aus 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 mM MnCl<sub>2</sub>, 3 mM ATP, 1 mM Thiamindiphosphat, 0.1% Tween-60, 1 mM Kaliumfluorid, 30  $\mu$ M (2-<sup>14</sup>C)-Pyruvat (0.5  $\mu$ Ci), 0.6 mM DL-Glycerinaldehyd-3-phosphat. Der Pflanzenextrakt wird 1 bis 2 Stunden in der Reaktionslösung bei 37°C inkubiert. Danach wird die Reaktion durch Erhitzen auf 80°C für 3 Minuten gestoppt. Nach Zentrifugation bei 13.000 Umdrehungen/Minute für 5 Minuten wird der Überstand evaporiert, der Rest in 50  $\mu$ l Methanol resuspendiert, auf eine TLC-Platte für Dünnschichtchromatographie (Silica-Gel 60, Merck, Darmstadt) aufgetragen und in N-Propylalkohol/Ethylacetat/Wasser (6:1:3; v/v/v) aufgetrennt. Dabei trennt sich radioaktiv markiertes D-1-deoxyxylulose-5-phosphat (oder D-1-deoxyxylulose) von (2-<sup>14</sup>C)-Pyruvat. Die Quantifizierung erfolgt mittels Scintillationszähler. Die Methode wurde beschrieben in Harker und Bramley (FEBS Letters 448 (1999) 115-119). Alternativ wurde ein fluorometrischer Assay zur Bestimmung der DXS-Synthaseaktivität von Querol und Kollegen beschrieben (Analytical Biochemistry 296 (2001) 101-105).

Unter 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase, auch 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Reduktoisomerase genannt, verstanden.

Unter einer 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat in  $\beta$ -Carotin umzuwandeln.

## 45

Dementsprechend wird unter 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase -Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase umgesetzte Menge 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat bzw. gebildete Menge Isopentenyl-Diphosphat verstanden.

Bei einer erhöhten 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase die umgesetzte Menge 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat bzw. die gebildete Menge Isopentenyl-Diphosphat erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase -Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität des Wildtyps.

20

Die Bestimmung der 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase -Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

25

Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure, 10 % Glycerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0,5 mM PMSF zugegeben.

Die Aktivität der D-1-Deoxyxylulose-5-Phosphat-Reduktoisomerase (DXR) wird gemessen in einem Puffer aus 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 0,3 mM NADPH und 0,3 mM 1-Deoxy-D-Xylulose-4-Phosphat, welches z.B. enzymatisch synthetisiert werden kann (Kuzuyama, Takahashi, Watanabe und Seto: Tetrahedon letters 39 (1998) 4509-4512). Die Reaktion wird durch Zugabe des Pflanzenextraktes gestartet. Das Reaktionsvolumen kann typischerweise 0,2 bis 0,5 mL betragen; die Inkubation erfolgt bei 37°C über 30-60 Minuten.

## 46

Während dieser Zeit wird die Oxidation von NADPH photometrisch bei 340 nm verfolgt.

Unter Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase -Aktivität wird die  
5 Enzymaktivität einer Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase verstanden.

Unter einer Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Isopentenyl-  
10 Diphosphat in Dimethylallylphosphat umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase umgesetzte Menge Isopentenyl-Di-  
15 phosphat bzw. gebildete Menge Dimethylallylphosphat verstanden.

Bei einer erhöhten Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Isopentenyl-Diphosphat-D-  
20 Isomerase die umgesetzte Menge Isopentenyl-Diphosphat bzw. die gebildete Menge Dimethylallylphosphat erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase -Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase Aktivität des Wildtyps.

30 Die Bestimmung der Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

35 Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung  
40 der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure, 10 % Glycerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und  
45 0,5 mM PMSF zugegeben.

## 47

Aktivitätsbestimmungen der Isopentenyl-Diphosphat-Isomerase (IPP-Isomerase) können nach der von Fraser und Kollegen vorgestellten Methode (Fraser, Römer, Shipton, Mills, Kiano, Misawa, Drake, Schuch und Bramley: Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (2002), 1092-1097, basierend auf Fraser, Pinto, Holloway und Bramley, Plant Journal 24 (2000), 551-558) durchgeführt werden. Für Enzymmessungen werden Inkubationen mit 0,5  $\mu$ Ci ( $1-^{14}$ C)IPP (Isopentenylpyrophosphat) (56 mCi/10 mmol, Amersham plc) als Substrat in 0,4 M Tris-HCl (pH 8,0) mit 1 mM DTT, 4 mM  $MgCl_2$ , 6 mM  $MnCl_2$ , 3 mM ATP, 0,1 % Tween 60, 1 mM Kaliumfluorid in einem Volumen von etwa 150-500  $\mu$ l durchgeführt. Extrakte werden mit Puffer gemischt (z.B. im Verhältnis 1:1) und für wenigstens 5 Stunden bei 28°C inkubiert. Danach wird etwa 15 200  $\mu$ l Methanol zugegeben und durch Zugabe von konzentrierter Salzsäure (Endkonzentration 25 %) eine Säurehydrolyse für etwa 1 Stunde bei 37°C durchgeführt. Anschließend erfolgt eine zweimalige Extraktion (jeweils 500  $\mu$ l) mit Petrolether (versetzt mit 10% Diethylether). Die Radioaktivität in einem Aliquot der Hyper-20 phase wird mittels Szintillationszähler bestimmt. Die spezifische Enzymaktivität kann bei kurzer Inkubation von 5 Minuten bestimmt werden, da kurze Reaktionszeiten die Bildung von Reaktionsnebenprodukten unterdrückt (siehe Lützow und Beyer: The isopentenyl-diphosphate  $\Delta$ -isomerase and its relation to the phytoene synthase 25 complex in daffodil chromoplasts; Biochim. Biophys. Acta 959 (1988), 118-126)

Unter Geranyl-Diphosphat-Synthase -Aktivität wird die Enzymaktivität einer Geranyl-Diphosphat-Synthase verstanden.

30

Unter einer Geranyl-Diphosphat-Synthase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Isopentenyl-Diphosphat und Dimethylallylphosphat in Geranyl-Diphosphat umzuwandeln.

35

Dementsprechend wird unter Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Geranyl-Diphosphat-Synthase umgesetzte Menge Isopentenyl-Diphosphat und/oder Dimethylallylphosphat bzw. gebildete Menge Geranyl-Diphosphat

40 verstanden.

Bei einer erhöhten Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Geranyl-Diphosphat-Synthase die 45 umgesetzte Menge Isopentenyl-Diphosphat und/oder Dimethylallylphosphat bzw. die gebildete Menge Geranyl-Diphosphat erhöht.

## 48

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Geranyl-Diphosphat-Synthase -Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität des Wildtyps.

Die Bestimmung der Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp-  
10 bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer  
15 in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus  
20 50 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure, 10 % Glycerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0,5 mM PMSF zugegeben.

25 Die Aktivität der Geranyl-Diphosphat-Synthase (GPP-Synthase) kann in 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 1 mM ATP, 0.2 % Tween-20, 5  $\mu$ M (<sup>14</sup>C)IPP und 50  $\mu$ M DMAPP (Dimethylallylpyrophosphat) nach Zugabe von Pflanzenextrakt bestimmt werden (nach Bouvier, Suire, d'Harlingue, Backhaus und Camara:  
30 Molecular cloning of geranyl diphosphate synthase and compartmentation of monoterpene synthesis in plant cells, Plant Journal 24 (2000,) 241-252). Nach der Inkubation von z.B. 2 Stunden bei 37°C werden die Reaktionsprodukte dephosphoryliert (nach Koyama, Fuji und Ogura: Enzymatic hydrolysis of polyprenyl pyrophosphates,  
35 Methods Enzymol. 110 (1985), 153-155) und mittels Dünnschichtchromatographie und Messung der inkorporierten Radioaktivität analysiert (Dogbo, Bardat, Quennemet und Camara: Metabolism of plastid terpenoids: In vitro inhibition of phytoene synthesis by phenethyl pyrophosphate derivatives, FEBS Letters 219 (1987)  
40 211-215).

Unter Farnesyl-Diphosphat-Synthase -Aktivität wird die Enzymaktivität einer Farnesyl-Diphosphat-Synthase verstanden.

## 49

Unter einer Farnesyl-Diphosphat-Synthase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Dimethylallyl-Diphosphate und Isopentenyl-Diphosphat in Farnesyl-Diphosphat umzuwandeln.

5

Dementsprechend wird unter Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Farnesyl-Diphosphat-Synthase umgesetzte Menge Dimethylallyl-Diphosphate und/oder Isopentenyl-Diphosphat bzw. gebildete Menge Farnesyl-Diphosphat

10 verstanden.

Bei einer erhöhten Farnesyl-Diphosphat-Synthase -Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Farnesyl-Diphosphat-Synthase die  
15 umgesetzte Menge Dimethylallyl-Diphosphate und/oder Isopentenyl-Diphosphat bzw. die gebildete Menge Farnesyl-Diphosphat erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Farnesyl-Diphosphat-Synthase -Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens  
20 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität des Wildtyps.

25 Die Bestimmung der Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

30 Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches  
35 möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure, 10 % Glycerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und  
40 0,5 mM PMSF zugegeben.

Die Aktivität der Farnesylpyrophosphat-Synthase (FPP-Synthase) kann nach einer Vorschrift von Joly und Edwards (Journal of Biological Chemistry 268 (1993), 26983-26989) bestimmt werden. Da-  
45 nach wird die Enzymaktivität in einem Puffer aus 10 mM HEPES (pH 7,2), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Dithiothreitol, 20  $\mu$ M Geranylpyrophosphat und 40  $\mu$ M (1-<sup>14</sup>C) Isopentenylpyrophosphat (4 Ci/mmol) gemessen.



## 50

Die Reaktionsmischung wird bei 37°C inkubiert; die Reaktion wird durch Zugabe von 2,5 N HCl (in 70 % Ethanol mit 19 µg/ml Farnesol) gestoppt. Die Reaktionsprodukte werden somit durch Säurehydrolyse bei 37°C innerhalb von 30 Minuten hydrolysiert. Durch  
5 Zugabe von 10% NaOH wird die Mischung neutralisiert und mit Hexan ausgeschüttelt. Ein Aliquot der Hexanphase kann zur Bestimmung der eingebauten Radioaktivität mittels Szintillationszähler gemessen werden.

- 10 Alternativ können nach Inkubation von Pflanzenextrakt und radioaktiv markierten IPP die Reaktionsprodukte mittels Dünnschichtchromatographie (Silica-Gel SE60, Merck) in Benzol/Methanol (9:1) getrennt werden. Radioaktiv markierte Produkte werden eluiert und die Radioaktivität bestimmt (nach Gaffe, Bru, Causse, Vidal,  
15 Stamitti-Bert, Carde und Gallusci: LEFPS1, a tomato farnesyl pyrophosphate gene highly expressed during early fruit development; Plant Physiology 123 (2000) 1351-1362).

Unter Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase -Aktivität wird die  
20 Enzymaktivität einer Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase verstanden.

Unter einer Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Farnesyl-Di-  
25 phosphat und Isopentenyl-Diphosphat in Geranyl-Geranyl-Diphosphat umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Geranyl-  
30 Geranyl-Diphosphat-Synthase umgesetzte Menge Farnesyl-Diphosphat und/oder Isopentenyl-Diphosphat bzw. gebildete Menge Geranyl-Geranyl-Diphosphat verstanden.

Bei einer erhöhten Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase -Aktivität  
35 gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase die umgesetzte Menge Farnesyl-Diphosphat und/oder Isopentenyl-Diphosphat bzw. die gebildete Menge Geranyl-Geranyl-Diphosphat erhöht.

40

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase -Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter  
45 mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Geranyl-Geranyl-Piphoosphat-Synthase-Aktivität des Wildtyps.

## 51

Die Bestimmung der Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase -Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

5

Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure, 10 % Glycerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0,5 mM PMSF zugegeben.

Aktivitätsmessungen der Geranylgeranylpyrophosphat-Synthase (GGPP-Synthase) können nach der von Dogbo und Camara beschriebenen Methode (in Biochim. Biophys. Acta 920 (1987), 140-148: Purification of isopentenyl pyrophosphate isomerase and geranylgeranyl pyrophosphate synthase from Capsicum chromoplasts by affinity chromatography) bestimmt werden. Dazu wird einem Puffer (50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 2 mM Dithiothreitol, (1-<sup>14</sup>C)IPP (0,1  $\mu$ Ci, 10  $\mu$ M), 15  $\mu$ M DMAPP, GPP oder FPP) mit einem Gesamtvolumen von etwa 200  $\mu$ l Pflanzenextrakt zugesetzt. Die Inkubation kann für 1-2 Stunden (oder länger) bei 30°C erfolgen. Die Reaktion wird durch Zugabe von 0,5 ml Ethanol und 0,1 ml 6N HCl. Nach 10minütiger Inkubation bei 37°C wird die Reaktionsmischung mit 6N NaOH neutralisiert, mit 1 ml Wasser vermischt und mit 4 ml Diethylether ausgeschüttelt. In einem Aliquot (z.B. 0,2 mL) der Etherphase wird mittels Szintillationszählung die Menge an Radioaktivität bestimmt. Alternativ können nach Säurehydrolyse die radioaktiv markierten Prenylalkohole in Ether ausgeschüttelt werden und mit HPLC (25 cm-Säule Spherisorb ODS-1, 5 $\mu$ m; Elution mit Methanol/Wasser (90:10; v/v) bei einer Flussrate von 1 ml/min) getrennt und mittels Radioaktivitätsmonitor quantifiziert werden (nach Wiedemann, Misawa und Sandmann: Purification and enzymatic characterization of the geranylgeranyl pyrophosphate synthase from Erwinia uredovora after expression in Escherichia coli;

Unter Phytoen-Synthase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Phytoen-Synthase verstanden.

45

## 52

Insbesondere wird unter einer Phytoen-Synthase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Geranyl-Geranyl-Diphosphat in Phytoen umzuwandeln.

- 5 Dementsprechend wird unter Phytoen-Synthase -Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Phytoen-Synthase umgesetzte Menge Geranyl-Geranyl-Diphosphat bzw. gebildete Menge Phytoen verstanden.
- 10 Bei einer erhöhten Phytoen-Synthase -Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Phytoen-Synthase die umgesetzte Menge Geranyl-Geranyl-Diphosphat bzw. die gebildete Menge Phytoen erhöht.
- 15 Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Phytoen-Synthase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Phytoen-Synthase-Aktivität des Wildtyps.

- Die Bestimmung der Phytoen-Synthase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:
- 25

- Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige
- 30 Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM
- 35 EGTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure, 10 % Glycerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0,5 mM PMSF zugegeben.

- Aktivitätsbestimmungen der Phytoen-Synthase (PSY) können nach der
- 40 von Fraser und Kollegen vorgestellten Methode (Fraser, Romer, Shipton, Mills, Kiano, Misawa, Drake, Schuch und Bramley: Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (2002), 1092-1097, basierend auf Fraser, Pinto, Holloway
- 45 und Bramley, Plant Journal 24 (2000) 551-558) durchgeführt werden. Für Enzymmessungen werden Inkubationen mit (<sup>3</sup>H)Geranyl-geranyl-pyrophosphat (15 mCi/mM, American Radiolabeled Chemicals,

## 53

St. Louis) als Substrat in 0.4 M Tris-HCl (pH 8,0) mit 1 mM DTT, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 6 mM Mn Cl<sub>2</sub>, 3 mM ATP, 0,1 % Tween 60, 1 mM Kaliumfluorid durchgeführt. Pflanzenextrakte werden mit Puffer gemischt, z B. 295 µl Puffer mit Extrakt in einem Gesamtvolumen  
5 von 500 µl. Inkubiert wird für wenigstens 5 Stunden bei 28°C. Anschließend wird Phytoene durch zweimaliges Ausschütteln (jeweils 500 µl) mit Chloroform extrahiert. Das während der Reaktion gebildete radioaktiv markierte Phytoene wird mittels Dünnschichtchromatographie auf Silicaplatten in Methanol/Wasser (95:5; v/v)  
10 getrennt. Phytoene kann in einer Jod-angereicherten Atmosphäre (durch Erhitzen weniger Iodkristalle) auf den Silicaplatten identifiziert werden. Ein Phytoene-Standard dient als Referenz. Die Menge an radioaktiv markiertem Produkt wird mittels Messung im Szintillationszähler bestimmt. Alternativ kann Phytoene auch  
15 mittels HPLC, die mit einem Radioaktivitätsdetektor versehen ist, quantifiziert werden (Fraser, Albrecht und Sandmann: Development of high performance liquid chromatographic systems for the separation of radiolabeled carotenes and precursors formed in specific enzymatic reactions; J. Chromatogr. 645 (1993) 265-272).

20

Unter Phytoen-Desaturase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Phytoen-Desaturase verstanden.

Unter einer Phytoen-Desaturase wird ein Protein verstanden,  
25 das die enzymatische Aktivität aufweist, Phytoen in Phytofluen und/oder Phytofluen in ζ-Carotin (Zetacarotin) umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Phytoen-Desaturase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Phytoen-Desaturase umgesetzte Menge Phytoen bzw. Phytofluen bzw. gebildete Menge Phytofluen bzw. ζ-Carotin verstanden.  
30

Bei einer erhöhten Phytoen-Desaturase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten  
35 Zeit durch das Protein Phytoen-Desaturase die umgesetzte Menge Phytoen bzw. Phytofluen bzw. die gebildete Menge Phytofluen bzw. ζ-Carotin erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Phytoen-Desaturase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Phytoen-Desaturase-Aktivität des Wildtyps.  
40

45

## 54

Die Bestimmung der Phytoen-Desaturase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

- 5 Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung
- 10 der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure, 10 % Glycerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und
- 15 0,5 mM PMSF zugegeben.

- Die Aktivität der Phytoen-Desaturase (PDS) kann durch die Inkorporation von radioaktiv markiertem (<sup>14</sup>C)-Phytoen in ungesättigte Carotine gemessen werden (nach Römer, Fraser, Kiano, Shipton,
- 20 Misawa, Schuch und Bramley: Elevation of the provitamin A content of transgenic tomato plants; Nature Biotechnology 18 (2000) 666-669). Radioaktiv markiertes Phytoene kann synthetisiert werden nach Fraser (Fraser, De la Rivas, Mackenzie, Bramley: Phycomyces blakesleanus CarB mutants: their use in assays of phytoene
- 25 desaturase; Phytochemistry 30 (1991), 3971-3976). Membranen von Plastiden des Zielgewebes können mit 100 mM MES-Puffer (pH 6,0) mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mM Dithiothreitol in einem Gesamtvolumen von 1 mL inkubiert werden. In Aceton gelöstes (<sup>14</sup>C)-Phytoen (etwa 100.000 Zerfälle/Minute für jeweils eine Inkubation) wird zuge-
- 30 geben, wobei die Acetonkonzentration 5 % (v/v) nicht übersteigen sollte. Diese Mischung wird bei 28°C für etwa 6 bis 7 Stunden im Dunklen unter Schütteln inkubiert. Danach werden Pigmente dreimal mit etwa 5 mL Petrolether (mit 10 % Diethylether versetzt) extrahiert und mittels HPLC getrennt und quantifiziert.

35

- Alternativ kann die Aktivität der Phytoen-Desaturase nach Fraser et al. (Fraser, Misawa, Linden, Yamano, Kobayashi und Sandmann: Expression in Escherichia coli, purification, and reactivation of the recombinant Erwinia uredovora phytoene desaturase, Journal of
- 40 Biological Chemistry 267 (1992), 19891-19895) gemessen werden.

Unter Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Zeta-Carotin-Desaturase verstanden.

## 55

Unter einer Zeta-Carotin-Desaturase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\zeta$ -Carotin in Neurosporin und/oder Neurosporin in Lycopin umzuwandeln.

- 5 Dementsprechend wird unter Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Zeta-Carotin-Desaturase umgesetzte Menge  $\zeta$ -Carotin oder Neurosporin bzw. gebildete Menge Neurosporin oder Lycopin verstanden.
- 10 Bei einer erhöhten Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Zeta-Carotin-Desaturase die umgesetzte Menge  $\zeta$ -Carotin oder Neurosporin bzw. die gebildete Menge Neurosporin oder Lycopin erhöht.
- 15 Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Zeta-Carotin-Desaturase - Aktivität des Wildtyps.
- 20

Die Bestimmung der Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

25

- Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer
- 30 in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus
- 35 50 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 10 mM  $MgCl_2$ , 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure, 10 % Glycerin, 5 mM  $KHCO_3$ . Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0,5 mM PMSF zugegeben.
- 40 Analysen zur Bestimmung der  $\xi$ -Carotin-Desaturase (ZDS-Desaturase) können in 0.2 M Kaliumphosphat (pH 7.8, Puffervolumen von etwa 1 ml) durchgeführt werden. Die Analysemethode dazu wurde von Breitenbach und Kollegen (Breitenbach, Kuntz, Takaichi und Sandmann: Catalytic properties of an expressed and purified higher plant
- 45 type  $\xi$ -carotene desaturase from Capsicum annuum; European Journal of Biochemistry. 265(1):376-383, 1999 Oct ) publiziert. Jeder Analyseansatz enthält 3 mg Phosphatidylcholin, das in 0,4 M Kali-

## 56

umphosphatpuffer (pH 7,8) suspendiert ist, 5 µg ξ-Carotin oder Neurosporene, 0,02 % Butylhydroxytoluol, 10 µl Decyl-Plastochinon (1 mM methanolische Stammlösung) und Pflanzenextrakt. Das Volumen des Pflanzenextraktes muß der Menge an vorhandener ZDS-Desaturase-Aktivität angepasst werden, um Quantifizierungen in einem linearen Messbereich zu ermöglichen. Inkubationen erfolgen typischerweise für etwa 17 Stunden bei kräftigem Schütteln (200 Umdrehungen/Minute) bei etwa 28°C im Dunklen. Carotinoide werden durch Zugabe von 4 ml Aceton bei 50°C für 10 Minuten unter Schütteln extrahiert. Aus dieser Mischung werden die Carotinoide in eine Petroletherphase (mit 10 % Diethylether) überführt. Die Dethylether/Petroletherphase wird unter Stickstoff evaporiert, die Carotinoide wieder in 20 µl gelöst und mittels HPLC getrennt und quantifiziert.

15

Unter crtISO -Aktivität wird die Enzymaktivität eines crtISO-Proteins verstanden.

Unter einem crtISO-Proteins wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, 7,9,7',9'-tetra-cis-Lycopin in all-trans-Lycopin umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter crtISO-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein crtISO umgesetzte Menge 7,9,7',9'-tetra-cis-Lycopin bzw. gebildete Menge all-trans-Lycopin verstanden.

Bei einer erhöhten crtISO-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das crtISO-Proteins die umgesetzte Menge 7,9,7',9'-tetra-cis-Lycopin bzw. die gebildete Menge all-trans-Lycopin erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der crtISO-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der crtISO-Aktivität des Wildtyps.

Unter FtsZ-Aktivität wird die physiologische Aktivität eines FtsZ-Proteins verstanden.

Unter einem FtsZ-Protein wird ein Protein verstanden, das eine Zellteilungs und Plastidenteilungs-fördernde Wirkung hat und Homologien zu Tubulinproteinen aufweist.

45

## 57

Unter MinD -Aktivität wird die physiologische Aktivität eines MinD -Proteins verstanden.

Unter einem MinD -Protein wird ein Protein verstanden, das eine multifunktionale Rolle bei der Zellteilung aufweist. Es ist eine Membran-assoziierte ATPase und kann innerhalb der Zelle eine oszillierende Bewegung von Pol zu Pol zeigen.

Weiterhin kann die Erhöhung der Aktivität von Enzymen des Nicht-Mevalonatweges zu einer weiteren Erhöhung des gewünschten Keto-carotenoid-Endproduktes führen. Beispiele hierfür sind die 4-Diphosphocytidyl-2-C-Methyl-D-Erythritol-Synthase, die 4-Diphosphocytidyl-2-C-Methyl-D-Erythritol-Kinase und die 2-C-Methyl-D-Erythritol-2,4-cyclodiphosphat-Synthase. Durch Änderungen der Genexpression der entsprechenden Gene kann die Aktivität der genannten Enzyme erhöht werden. Die veränderten Konzentrationen der relevanten Proteine können standardgemäß mittels Antikörpern und entsprechenden Blotting-techniken nachgewiesen werden. Die Erhöhung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und/oder (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität und/oder Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Aktivität und/oder Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität und/oder Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität und/oder Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität und/oder Phytoen-Synthase-Aktivität und/oder Phytoen-Desaturase-Aktivität und/oder Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität und/oder crtISO-Aktivität und/oder FtsZ-Aktivität und/oder MinD-Aktivität kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Expressions- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression von Nukleinsäuren kodierend eine HMG-CoA-Reduktase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Desaturase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase und/oder Nukleinsäuren kodierend ein crtISO-Protein und/oder Nukleinsäuren kodierend ein FtsZ-Protein



und/oder Nukleinsäuren kodierend ein MinD-Protein gegenüber dem Wildtyp.

- Die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäuren kodierend
- 5 eine HMG-CoA-Reduktase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase und/oder Nukleinsäuren kodierend
- 10 eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Synthase und/oder
- 15 Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Desaturase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase und/oder Nukleinsäuren kodierend ein crtISO-Protein und/oder Nukleinsäuren kodierend ein FtsZ-Protein und/oder Nukleinsäuren kodierend ein MinD-Protein gegenüber dem Wildtyp kann ebenfalls durch
- 20 verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Induzierung des HMG-CoA-Reduktase-Gens und/oder (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Gens und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Gens und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Gens und/oder Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Iso-
- 25 merase-Gens und/oder Geranyl-Diphosphat-Synthase-Gens und/oder Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Gens und/oder Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Gens und/oder Phytoen-Synthase-Gens und/oder Phytoen-Desaturase-Gens und/oder Zeta-Carotin-Desaturase-Gens und/oder crtISO-Gens und/oder FtsZ-Gens und/oder MinD-Gens durch
- 30 Aktivatoren oder durch Einbringen von einer oder mehrerer Kopien des HMG-CoA-Reduktase-Gens und/oder (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Gens und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Gens und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Gens und/oder Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Gens
- 35 und/oder Geranyl-Diphosphat-Synthase-Gens und/oder Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Gens und/oder Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Gens und/oder Phytoen-Synthase-Gens und/oder Phytoen-Desaturase-Gens und/oder Zeta-Carotin-Desaturase-Gens und/oder crtISO-Gens und/oder FtsZ-Gens und/oder MinD-Gens, also durch
- 40 Einbringen mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine HMG-CoA-Reduktase und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und/oder mindestens einer Nukleinsäure
- 45 säure kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase und/oder mindestens einer Nukleinsäure

kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder mindestens  
 einer Nukleinsäure kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase  
 und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Geranyl-  
 geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder mindestens einer Nuklein-  
 5 säure kodierend eine Phytoen-Synthase und/oder mindestens einer  
 Nukleinsäure kodierend eine Phytoen-Desaturase und/oder min-  
 destens einer Nukleinsäure kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase  
 und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend ein crtISO-  
 Protein und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend ein  
 10 FtsZ-Protein und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend  
 ein MinD-Protein in die Pflanze.

Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend  
 eine HMG-CoA-Reduktase und/oder (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-  
 15 Diphosphat-Reduktase und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-  
 Synthase und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase  
 und/oder Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase und/oder Geranyl-  
 Diphosphat-Synthase und/oder Farnesyl-Diphosphat-Synthase  
 und/oder Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Phytoen-  
 20 Synthase und/oder Phytoen-Desaturase und/oder Zeta-Carotin-  
 Desaturase und/oder ein crtISO-Protein und/oder FtsZ-Protein  
 und/oder MinD-Protein wird erfindungsgemäß auch die Manipulation  
 der Expression der Pflanzen eigenen, endogenen HMG-CoA-Reduktase  
 und/oder (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase  
 25 und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und/oder 1-Deoxy-  
 D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase und/oder Isopentenyl-Di-  
 phosphat- $\Delta$ -Isomerase und/oder Geranyl-Diphosphat-Synthase  
 und/oder Farnesyl-Diphosphat-Synthase und/oder Geranyl-geranyl-  
 Diphosphat-Synthase und/oder Phytoen-Synthase und/oder Phytoen-  
 30 Desaturase und/oder Zeta-Carotin-Desaturase und/oder des  
 Pflanzen eigenen crtISO-Proteins und/oder FtsZ-Proteins und/oder  
 MinD-Proteins verstanden.

Dies kann beispielsweise durch Veränderung der entsprechenden  
 35 Promotor DNA-Sequenz erreicht werden. Eine solche Veränderung,  
 die eine erhöhte Expressionsrate des Gens zur Folge hat, kann  
 beispielsweise durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen  
 erfolgen.

40 In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der  
 Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine HMG-CoA-Reduktase  
 und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure  
 kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-  
 Reduktase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nuk-  
 45 leinsäure kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase  
 und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure  
 kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase und/

oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Phytoen-Synthase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Phytoen-Desaturase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend ein crtISO-Protein und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend ein FtsZ-Protein und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend ein MinD-Protein durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine HMG-CoA-Reduktase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Phytoen-Synthase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Phytoen-Desaturase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend ein crtISO-Protein und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend ein FtsZ-Protein und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend ein MinD-Protein in die Pflanze.

40

Dazu kann prinzipiell jedes HMG-CoA-Reduktase-Gen bzw.

(E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Gen bzw. 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Gen bzw. 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Gen bzw. Isopentenyl-Diphosphat-

45  $\Delta$ -Isomerase-Gen bzw. Geranyl-Diphosphat-Synthase-Gen bzw.

Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Gen bzw. Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Gen bzw. Phytoen-Synthase-Gen bzw. Phytoen-Desaturase-

## 61

Gen bzw. Zeta-Carotin-Desaturase-Gen bzw. crtISO-Gen bzw. FtsZ-Gen bzw. MinD-Gen verwendet werden.

- Bei genomischen HMG-CoA-Reduktase-Sequenzen bzw. (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Sequenzen bzw. 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Sequenzen bzw. 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Sequenzen bzw. Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Sequenzen bzw. Geranyl-Diphosphat-Synthase-Sequenzen bzw. Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Sequenzen bzw.
- 10 Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Sequenzen bzw. Phytoen-Synthase-Sequenzen bzw. Phytoen-Desaturase-Sequenzen bzw. Zeta-Carotin-Desaturase-Sequenzen bzw. crtISO-Sequenzen bzw. FtsZ-Sequenzen bzw. MinD-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall das die Wirtspflanze nicht
- 15 in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Proteine zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.
- 20 In den erfindungsgemäßen bevorzugten transgenen Pflanzen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres HMG-CoA-Reduktase-Gen und/oder (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Gen und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Gen und/oder 1-Deoxy-
- 25 D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Gen und/oder Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Gen und/oder Geranyl-Diphosphat-Synthase-Gen und/oder Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Gen und/oder Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Gen und/oder Phytoen-Synthase-Gen und/oder Phytoen-Desaturase-Gen und/oder Zeta-Carotin-Desaturase-
- 30 Gen und/oder crtISO-Gen und/oder FtsZ-Gen und/oder MinD-Gen vor.

- In dieser bevorzugten Ausführungsform weist die genetisch veränderte Pflanze beispielsweise mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine HMG-CoA-Reduktase oder mindestens zwei
- 35 endogene Nukleinsäuren, kodierend eine HMG-CoA-Reduktase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase und/oder
- 40 mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase oder mindestens
- 45 zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase

## 62

oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Phytoen-Synthase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Phytoen-Synthase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Phytoen-Desaturase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Phytoen-Desaturase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend ein crtISO-Protein oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend ein crtISO-Protein und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend ein FtsZ-Protein oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine FtsZ-Protein und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend ein MinD-Protein oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend ein MinD-Protein auf.

Beispiele für HMG-CoA-Reduktase-Gene sind:

30 Eine Nukleinsäure, kodierend eine HMG-CoA-Reduktase aus *Arabidopsis thaliana*, Accession NM\_106299; (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 99, Protein: SEQ ID NO: 100),

sowie weitere HMG-CoA-Reduktase -Gene aus anderen Organismen mit  
35 den folgenden Accession Nummern:

P54961, P54870, P54868, P54869, O02734, P22791, P54873, P54871, P23228, P13704, P54872, Q01581, P17425, P54874, P54839, P14891, P34135, O64966, P29057, P48019, P48020, P12683, P43256, Q9XEL8,  
40 P34136, O64967, P29058, P48022, Q41437, P12684, Q00583, Q9XHL5, Q41438, Q9YAS4, O76819, O28538, Q9Y7D2, P54960, O51628, P48021, Q03163, P00347, P14773, Q12577, Q59468, P04035, O24594, P09610, Q58116, O26662, Q01237, Q01559, Q12649, O74164, O59469, P51639, Q10283, O08424, P20715, P13703, P13702, Q96UG4, Q8SQZ9, O15888,  
45 Q9TUM4, P93514, Q39628, P93081, P93080, Q944T9, Q40148, Q84MM0, Q84LS3, Q9Z9N4, Q9KLM0

## 63

Beispiele für (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Gene sind:

- Eine Nukleinsäure, kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase aus *Arabidopsis thaliana* (lytB/ISPH),  
 5 ACCESSION AY168881, (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 101, Protein: SEQ ID NO:102),

- sowie weitere (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase -Gene aus anderen Organismen mit den folgenden Accession Nummern:

- T04781, AF270978\_1, NP\_485028.1, NP\_442089.1, NP\_681832.1, ZP\_00110421.1, ZP\_00071594.1, ZP\_00114706.1, ISPH\_SYNY3,  
 15 ZP\_00114087.1, ZP\_00104269.1, AF398145\_1, AF398146\_1, AAD55762.1, AF514843\_1, NP\_622970.1, NP\_348471.1, NP\_562001.1, NP\_223698.1, NP\_781941.1, ZP\_00080042.1, NP\_859669.1, NP\_214191.1, ZP\_00086191.1, ISPH\_VIBCH, NP\_230334.1, NP\_742768.1, NP\_302306.1, ISPH\_MYCLE, NP\_602581.1, ZP\_00026966.1, NP\_520563.1, NP\_253247.1,  
 20 NP\_282047.1, ZP\_00038210.1, ZP\_00064913.1, CAA61555.1, ZP\_00125365.1, ISPH\_ACICA, EAA24703.1, ZP\_00013067.1, ZP\_00029164.1, NP\_790656.1, NP\_217899.1, NP\_641592.1, NP\_636532.1, NP\_719076.1, NP\_660497.1, NP\_422155.1, NP\_715446.1, ZP\_00090692.1, NP\_759496.1, ISPH\_BURPS, ZP\_00129657.1,  
 25 NP\_215626.1, NP\_335584.1, ZP\_00135016.1, NP\_789585.1, NP\_787770.1, NP\_769647.1, ZP\_00043336.1, NP\_242248.1, ZP\_00008555.1, NP\_246603.1, ZP\_00030951.1, NP\_670994.1, NP\_404120.1, NP\_540376.1, NP\_733653.1, NP\_697503.1, NP\_840730.1, NP\_274828.1, NP\_796916.1, ZP\_00123390.1, NP\_824386.1,  
 30 NP\_737689.1, ZP\_00021222.1, NP\_757521.1, NP\_390395.1, ZP\_00133322.1, CAD76178.1, NP\_600249.1, NP\_454660.1, NP\_712601.1, NP\_385018.1, NP\_751989.1

Beispiele für 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase -Gene sind:

35

Eine Nukleinsäure, kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase aus *Lycopersicon esculentum*, ACCESSION #AF143812 (Nukleinsäure: SEQ ID NO:103 , Protein: SEQ ID NO: 104),

- sowie weitere 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase -Gene aus anderen Organismen mit den folgenden Accession Nummern:  
 AF143812\_1, DXS\_CAPAN, CAD22530.1, AF182286\_1, NP\_193291.1, T52289, AAC49368.1, AAP14353.1, D71420, DXS\_ORYSA, AF443590\_1, BAB02345.1, CAA09804.2, NP\_850620.1, CAD22155.2, AAM65798.1,  
 45 NP\_566686.1, CAD22531.1, AAC33513.1, CAC08458.1, AAG10432.1, T08140, AAP14354.1, AF428463\_1, ZP\_00010537.1, NP\_769291.1, AAK59424.1, NP\_107784.1, NP\_697464.1, NP\_540415.1, NP\_196699.1,

## 64

NP\_384986.1, ZP\_00096461.1, ZP\_00013656.1, NP\_353769.1,  
 BAA83576.1, ZP\_00005919.1, ZP\_00006273.1, NP\_420871.1,  
 AAM48660.1, DXS\_RHOCA, ZP\_00045608.1, ZP\_00031686.1, NP\_841218.1,  
 ZP\_00022174.1, ZP\_00086851.1, NP\_742690.1, NP\_520342.1,  
 5 ZP\_00082120.1, NP\_790545.1, ZP\_00125266.1, CAC17468.1,  
 NP\_252733.1, ZP\_00092466.1, NP\_439591.1, NP\_414954.1,  
 NP\_752465.1, NP\_622918.1, NP\_286162.1, NP\_836085.1, NP\_706308.1,  
 ZP\_00081148.1, NP\_797065.1, NP\_213598.1, NP\_245469.1,  
 ZP\_00075029.1, NP\_455016.1, NP\_230536.1, NP\_459417.1,  
 10 NP\_274863.1, NP\_283402.1, NP\_759318.1, NP\_406652.1, DXS\_SYNLE,  
 DXS\_SYNP7, NP\_440409.1, ZP\_00067331.1, ZP\_00122853.1,  
 NP\_717142.1, ZP\_00104889.1, NP\_243645.1, NP\_681412.1, DXS\_SYNEL,  
 NP\_637787.1, DXS\_CHLTE, ZP\_00129863.1, NP\_661241.1, DXS\_XANCP,  
 NP\_470738.1, NP\_484643.1, ZP\_00108360.1, NP\_833890.1,  
 15 NP\_846629.1, NP\_658213.1, NP\_642879.1, ZP\_00039479.1,  
 ZP\_00060584.1, ZP\_00041364.1, ZP\_00117779.1, NP\_299528.1  
 Beispiele für 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Gene  
 sind:

20 Eine Nukleinsäure, kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-  
 Reduktoisomerase aus *Arabidopsis thaliana*, ACCESSION #AF148852,  
 (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 105 , Protein: SEQ ID NO: 106),

sowie weitere 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Gene

25 aus anderen Organismen mit den folgenden Accession Nummern:

AF148852, AY084775, AY054682, AY050802, AY045634, AY081453,  
 AY091405, AY098952, AJ242588, AB009053, AY202991, NP\_201085.1,  
 T52570, AF331705\_1, BAB16915.1, AF367205\_1, AF250235\_1,  
 30 CAC03581.1, CAD22156.1, AF182287\_1, DXR\_MENPI, ZP\_00071219.1,  
 NP\_488391.1, ZP\_00111307.1, DXR\_SYNLE, AAP56260.1, NP\_681831.1,  
 NP\_442113.1, ZP\_00115071.1, ZP\_00105106.1, ZP\_00113484.1,  
 NP\_833540.1, NP\_657789.1, NP\_661031.1, DXR\_BACHD, NP\_833080.1,  
 NP\_845693.1, NP\_562610.1, NP\_623020.1, NP\_810915.1, NP\_243287.1,  
 35 ZP\_00118743.1, NP\_464842.1, NP\_470690.1, ZP\_00082201.1,  
 NP\_781898.1, ZP\_00123667.1, NP\_348420.1, NP\_604221.1,  
 ZP\_00053349.1, ZP\_00064941.1, NP\_246927.1, NP\_389537.1,  
 ZP\_00102576.1, NP\_519531.1, AF124757\_19, DXR\_ZYMMO, NP\_713472.1,  
 NP\_459225.1, NP\_454827.1, ZP\_00045738.1, NP\_743754.1, DXR\_PSEPK,  
 40 ZP\_00130352.1, NP\_702530.1, NP\_841744.1, NP\_438967.1, AF514841\_1,  
 NP\_706118.1, ZP\_00125845.1, NP\_404661.1, NP\_285867.1,  
 NP\_240064.1, NP\_414715.1, ZP\_00094058.1, NP\_791365.1,  
 ZP\_00012448.1, ZP\_00015132.1, ZP\_00091545.1, NP\_629822.1,  
 NP\_771495.1, NP\_798691.1, NP\_231885.1, NP\_252340.1,  
 45 ZP\_00022353.1, NP\_355549.1, NP\_420724.1, ZP\_00085169.1,  
 EAA17616.1, NP\_273242.1, NP\_219574.1, NP\_387094.1, NP\_296721.1,  
 ZP\_00004209.1, NP\_823739.1, NP\_282934.1, BAA77848.1, NP\_660577.1,

## 65

NP\_760741.1, NP\_641750.1, NP\_636741.1, NP\_829309.1, NP\_298338.1, NP\_444964.1, NP\_717246.1, NP\_224545.1, ZP\_00038451.1, DXR\_KITGR, NP\_778563.1.

5 Beispiele für Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Gene sind:

Eine Nukleinsäure, kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase aus *Adonis palaestina* clone ApIPI28, (ipiAa1), ACCESSION #AF188060, veröffentlicht durch Cunningham, F.X. Jr. and Gantt, E.:

- 10 Identification of multi-gene families encoding isopentenyl diphosphate isomerase in plants by heterologous complementation in *Escherichia coli*, *Plant Cell Physiol.* 41 (1), 119-123 (2000) (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 107, Protein: SEQ ID NO: 108),

- 15 sowie weitere Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Gene aus anderen Organismen mit den folgenden Accession Nummern:

- Q38929, O48964, Q39472, Q13907, O35586, P58044, O42641, O35760, Q10132, P15496, Q9YB30, Q8YNH4, Q42553, O27997, P50740, O51627,  
 20 O48965, Q8KFR5, Q39471, Q39664, Q9RVE2, Q01335, Q9HHE4, Q9BXS1, Q9KWF6, Q9CIF5, Q88WB6, Q92BX2, Q8Y7A5, Q8TT35, Q9KK75, Q8NN99, Q8XD58, Q8FE75, Q46822, Q9HP40, P72002, P26173, Q9Z5D3, Q8Z3X9, Q8ZM82, Q9X7Q6, O13504, Q9HFW8, Q8NJL9, Q9UUQ1, Q9NH02, Q9M6K9, Q9M6K5, Q9FXR6, O81691, Q9S7C4, Q8S3L8, Q9M592, Q9M6K3, Q9M6K7,  
 25 Q9FV48, Q9LLB6, Q9AVJ1, Q9AVG8, Q9M6K6, Q9AVJ5, Q9M6K2, Q9AYS5, Q9M6K8, Q9AVG7, Q8S3L7, Q8W250, Q94IE1, Q9AVI8, Q9AYS6, Q9SAY0, Q9M6K4, Q8GVZ0, Q84RZ8, Q8KZ12, Q8KZ66, Q8FND7, Q88QC9, Q8BFZ6, BAC26382, CAD94476.

30 Beispiele für Geranyl-Diphosphat-Synthase -Gene sind:

Eine Nukleinsäure, kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase aus *Arabidopsis thaliana*, ACCESSION #Y17376, Bouvier, F., Suire, C., d'Harlingue, A., Backhaus, R.A. and Camara, B.; Molecular cloning

- 35 of geranyl diphosphate synthase and compartmentation of monoterpene synthesis in plant cells, *Plant J.* 24 (2), 241-252 (2000) (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 109, Protein: SEQ ID NO: 110),

sowie weitere Geranyl-Diphosphat-Synthase-Gene aus anderen

- 40 Organismen mit den folgenden Accession Nummern:

Q9FT89, Q8LKJ2, Q9FSW8, Q8LKJ3, Q9SBR3, Q9SBR4, Q9FET8, Q8LKJ1, Q84LG1, Q9JK86



## 66

Beispiele für Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Gene sind:

Eine Nukleinsäure, kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase aus *Arabidopsis thaliana* (FPS1), ACCESSION #U80605, veröffentlicht durch Cunillera, N., Arro, M., Delourme, D., Karst, F., Boron, A. und Ferrer, A.: *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed farnesyl-diphosphate synthase genes, J. Biol. Chem. 271 (13), 7774-7780 (1996), (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 111, Protein: SEQ ID NO: 112),

10

sowie weitere Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Gene aus anderen Organismen mit den folgenden Accession Nummern:

P53799, P37268, Q02769, Q09152, P49351, O24241, Q43315, P49352, O24242, P49350, P08836, P14324, P49349, P08524, O66952, Q08291, P54383, Q45220, P57537, Q8K9A0, P22939, P45204, O66126, P55539, Q9SWH9, Q9AVI7, Q9FRX2, Q9AYS7, Q94IE8, Q9FXR9, Q9ZWF6, Q9FXR8, Q9AR37, O50009, Q94IE9, Q8RVK7, Q8RVQ7, O04882, Q93RA8, Q93RB0, Q93RB4, Q93RB5, Q93RB3, Q93RB1, Q93RB2, Q920E5.

20

Beispiele für Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase -Gene sind:

Eine Nukleinsäure, kodierend eine Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase aus *Sinaps alba*, ACCESSION #X98795, veröffentlicht durch Bonk, M., Hoffmann, B., Von Lintig, J., Schledz, M., Al-Babili, S., Hobeika, E., Kleinig, H. and Beyer, P.: Chloroplast import of four carotenoid biosynthetic enzymes in vitro reveals differential fates prior to membrane binding and oligomeric assembly, Eur. J. Biochem. 247 (3), 942-950 (1997), (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 113, Protein: SEQ ID NO: 114),

30

sowie weitere Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Gene aus anderen Organismen mit den folgenden Accession Nummern:

P22873, P34802, P56966, P80042, Q42698, Q92236, O95749, Q9WTN0, Q50727, P24322, P39464, Q9FXR3, Q9AYN2, Q9FXR2, Q9AVG6, Q9FRW4, Q9SXZ5, Q9AVJ7, Q9AYN1, Q9AVJ4, Q9FXR7, Q8LSC5, Q9AVJ6, Q8LSC4, Q9AVJ3, Q9SSU0, Q9SXZ6, Q9SST9, Q9AVJ0, Q9AVI9, Q9FRW3, Q9FXR5, Q94IF0, Q9FRX1, Q9K567, Q93RA9, Q93QX8, CAD95619, EAA31459

40

Beispiele für Phytoen-Synthase-Gene sind:

Eine Nukleinsäure, kodierend eine Phytoen-Synthase aus *Erwinia uredovora*, ACCESSION # D90087; veröffentlicht durch Misawa, N., Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Izawa, Y., Nakamura, K. und Harashima, K.: Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products

45

## 67

expressed in *Escherichia coli*; J. Bacteriol. 172 (12), 6704-6712 (1990), (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 115, Protein: SEQ ID NO: 116),

sowie weitere Phytoen-Synthase -Gene aus anderen Organismen mit  
5 den folgenden Accession Nummern:

CAB39693, BAC69364, AAF10440, CAA45350, BAA20384, AAM72615,  
BAC09112, CAA48922, P\_001091, CAB84588, AAF41518, CAA48155,  
AAD38051, AAF33237, AAG10427, AAA34187, BAB73532, CAC19567,  
10 AAM62787, CAA55391, AAB65697, AAM45379, CAC27383, AAA32836,  
AAK07735, BAA84763, P\_000205, AAB60314, P\_001163, P\_000718,  
AAB71428, AAA34153, AAK07734, CAA42969, CAD76176, CAA68575,  
P\_000130, P\_001142, CAA47625, CAA85775, BAC14416, CAA79957,  
BAC76563, P\_000242, P\_000551, AAL02001, AAK15621, CAB94795,  
15 AAA91951, P\_000448

Beispiele für Phytoen-Desaturase-Gene sind:

Eine Nukleinsäure, kodierend eine Phytoen-Desaturase aus *Erwinia*  
20 *uredovora*, ACCESSION # D90087; veröffentlicht durch Misawa, N.,  
Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Izawa, Y., Nakamura, K. und  
Harashima, K.: Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid  
biosynthetic pathway by functional analysis of gene products ex-  
pressed in *Escherichia coli*; J. Bacteriol. 172 (12), 6704-6712  
25 (1990), (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 117, Protein: SEQ ID NO: 118),

sowie weitere Phytoen-Desaturase -Gene aus anderen Organismen  
mit den folgenden Accession Nummern:

30 AAL15300, A39597, CAA42573, AAK51545, BAB08179, CAA48195,  
BAB82461, AAK92625, CAA55392, AAG10426, AAD02489, AAO24235,  
AAC12846, AAA99519, AAL38046, CAA60479, CAA75094, ZP\_001041,  
ZP\_001163, CAA39004, CAA44452, ZP\_001142, ZP\_000718, BAB82462,  
AAM45380, CAB56040, ZP\_001091, BAC09113, AAP79175, AAL80005,  
35 AAM72642, AAM72043, ZP\_000745, ZP\_001141, BAC07889, CAD55814,  
ZP\_001041, CAD27442, CAE00192, ZP\_001163, ZP\_000197, BAA18400,  
AAG10425, ZP\_001119, AAF13698, 2121278A, AAB35386, AAD02462,  
BAB68552, CAC85667, AAK51557, CAA12062, AAG51402, AAM63349,  
AAF85796, BAB74081, AAA91161, CAB56041, AAC48983, AAG14399,  
40 CAB65434, BAB73487, ZP\_001117, ZP\_000448, CAB39695, CAD76175,  
BAC69363, BAA17934, ZP\_000171, AAF65586, ZP\_000748, BAC07074,  
ZP\_001133, CAA64853, BAB74484, ZP\_001156, AAF23289, AAG28703,  
AAP09348, AAM71569, BAB69140, ZP\_000130, AAF41516, AAG18866,  
CAD95940, NP\_656310, AAG10645, ZP\_000276, ZP\_000192, ZP\_000186,  
45 AAM94364, EAA31371, ZP\_000612, BAC75676, AAF65582

Beispiele für Zeta-Carotin-Desaturase-Gene sind:

- Eine Nukleinsäure, kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase aus *Narcissus pseudonarcissus*, ACCESSION #AJ224683, veröffentlicht durch Al-Babili, S., Oelschlegel, J. and Beyer, P.: A cDNA encoding for beta carotene desaturase (Accession No. AJ224683) from *Narcissus pseudonarcissus* L.. (PGR98-103), *Plant Physiol.* 117, 719-719 (1998), (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 119, Protein: SEQ ID NO: 120),
- 10 sowie weitere Zeta-Carotin-Desaturase-Gene aus anderen Organismen mit den folgenden Accession Nummern:

- Q9R6X4, Q38893, Q9SMJ3, Q9SE20, Q9ZTP4, O49901, P74306, Q9FV46, Q9RCT2, ZDS\_NARPS, BAB68552.1, CAC85667.1, AF372617\_1, ZDS\_TARER, CAD55814.1, CAD27442.1, 2121278A, ZDS\_CAPAN, ZDS\_LYCES, NP\_187138.1, AAM63349.1, ZDS\_ARATH, AAA91161.1, ZDS\_MAIZE, AAG14399.1, NP\_441720.1, NP\_486422.1, ZP\_00111920.1, CAB56041.1, ZP\_00074512.1, ZP\_00116357.1, NP\_681127.1, ZP\_00114185.1, ZP\_00104126.1, CAB65434.1, NP\_662300.1

20

Beispiele für crtISO-Gene sind:

- Eine Nukleinsäure, kodierend eine crtISO aus *Lycopersicon esculentum*; ACCESSION #AF416727, veröffentlicht durch Isaacson, T., Ronen, G., Zamir, D. and Hirschberg, J.: Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of beta-carotene and xanthophylls in plants; *Plant Cell* 14 (2), 333-342 (2002), (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 121, Protein: SEQ ID NO: 122),

30

sowie weitere crtISO -Gene aus anderen Organismen mit den folgenden Accession Nummern:

AAM53952

35

Beispiele für FtsZ-Gene sind:

- Eine Nukleinsäure, kodierend eine FtsZ aus *Tagetes erecta*, ACCESSION #AF251346, veröffentlicht durch Moehs, C.P., Tian, L., Osteryoung, K.W. and Dellapenna, D.: Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development *Plant Mol. Biol.* 45 (3), 281-293 (2001), (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 123, Protein: SEQ ID NO: 124),

45

## 69

sowie weitere FtsZ -Gene aus anderen Organismen mit den folgenden Accession Nummern:

- CAB89286.1, AF205858\_1, NP\_200339.1, CAB89287.1, CAB41987.1,  
 5 AAA82068.1, T06774, AF383876\_1, BAC57986.1, CAD22047.1,  
 BAB91150.1, ZP\_00072546.1, NP\_440816.1, T51092, NP\_683172.1,  
 BAA85116.1, NP\_487898.1, JC4289, BAA82871.1, NP\_781763.1,  
 BAC57987.1, ZP\_00111461.1, T51088, NP\_190843.1, ZP\_00060035.1,  
 NP\_846285.1, AAL07180.1, NP\_243424.1, NP\_833626.1, AAN04561.1,  
 10 AAN04557.1, CAD22048.1, T51089, NP\_692394.1, NP\_623237.1,  
 NP\_565839.1, T51090, CAA07676.1, NP\_113397.1, T51087, CAC44257.1,  
 E84778, ZP\_00105267.1, BAA82091.1, ZP\_00112790.1, BAA96782.1,  
 NP\_348319.1, NP\_471472.1, ZP\_00115870.1, NP\_465556.1,  
 NP\_389412.1, BAA82090.1, NP\_562681.1, AAM22891.1, NP\_371710.1,  
 15 NP\_764416.1, CAB95028.1, FTSZ\_STRGR, AF120117\_1, NP\_827300.1,  
 JE0282, NP\_626341.1, AAC45639.1, NP\_785689.1, NP\_336679.1,  
 NP\_738660.1, ZP\_00057764.1, AAC32265.1, NP\_814733.1, FTSZ\_MYCKA,  
 NP\_216666.1, CAA75616.1, NP\_301700.1, NP\_601357.1, ZP\_00046269.1,  
 CAA70158.1, ZP\_00037834.1, NP\_268026.1, FTSZ\_ENTHR, NP\_787643.1,  
 20 NP\_346105.1, AAC32264.1, JC5548, AAC95440.1, NP\_710793.1,  
 NP\_687509.1, NP\_269594.1, AAC32266.1, NP\_720988.1, NP\_657875.1,  
 ZP\_00094865.1, ZP\_00080499.1, ZP\_00043589.1, JC7087, NP\_660559.1,  
 AAC46069.1, AF179611\_14, AAC44223.1, NP\_404201.1.

## 25 Beispiele für MinD -Gene sind:

- Eine Nukleinsäure, kodierend eine MinD aus *Tagetes erecta*,  
 ACCESSION #AF251019, veröffentlicht durch Moehs, C.P., Tian, L.,  
 Osteryoung, K.W. und Dellapenna, D.: Analysis of carotenoid bio-  
 30 synthetic gene expression during marigold petal development;  
 Plant Mol. Biol. 45 (3), 281-293 (2001), (Nukleinsäure: SEQ ID  
 NO: 125, Protein: SEQ ID NO: 126),

sowie weitere MinD -Gene mit den folgenden Accession Nummern:

## 35

- NP\_197790.1, BAA90628.1, NP\_038435.1, NP\_045875.1, AAN33031.1,  
 NP\_050910.1, CAB53105.1, NP\_050687.1, NP\_682807.1, NP\_487496.1,  
 ZP\_00111708.1, ZP\_00071109.1, NP\_442592.1, NP\_603083.1,  
 NP\_782631.1, ZP\_00097367.1, ZP\_00104319.1, NP\_294476.1,  
 40 NP\_622555.1, NP\_563054.1, NP\_347881.1, ZP\_00113908.1,  
 NP\_834154.1, NP\_658480.1, ZP\_00059858.1, NP\_470915.1,  
 NP\_243893.1, NP\_465069.1, ZP\_00116155.1, NP\_390677.1,  
 NP\_692970.1, NP\_298610.1, NP\_207129.1, ZP\_00038874.1,  
 NP\_778791.1, NP\_223033.1, NP\_641561.1, NP\_636499.1,  
 45 ZP\_00088714.1, NP\_213595.1, NP\_743889.1, NP\_231594.1,  
 ZP\_00085067.1, NP\_797252.1, ZP\_00136593.1, NP\_251934.1,  
 NP\_405629.1, NP\_759144.1, ZP\_00102939.1, NP\_793645.1,

NP\_699517.1, NP\_460771.1, NP\_860754.1, NP\_456322.1, NP\_718163.1, NP\_229666.1, NP\_357356.1, NP\_541904.1, NP\_287414.1, NP\_660660.1, ZP\_00128273.1, NP\_103411.1, NP\_785789.1, NP\_715361.1, AF149810\_1, NP\_841854.1, NP\_437893.1, ZP\_00022726.1, EAA24844.1,  
 5 ZP\_00029547.1, NP\_521484.1, NP\_240148.1, NP\_770852.1, AF345908\_2, NP\_777923.1, ZP\_00048879.1, NP\_579340.1, NP\_143455.1, NP\_126254.1, NP\_142573.1, NP\_613505.1, NP\_127112.1, NP\_712786.1, NP\_578214.1, NP\_069530.1, NP\_247526.1, AAA85593.1, NP\_212403.1, NP\_782258.1, ZP\_00058694.1, NP\_247137.1, NP\_219149.1,  
 10 NP\_276946.1, NP\_614522.1, ZP\_00019288.1, CAD78330.1

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als HMG-CoA-Reduktase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID  
 15 NO: 100 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der  
 20 Sequenz SEQ ID NO: 100, und die die enzymatische Eigenschaft einer HMG-CoA-Reduktase aufweisen.

Weitere Beispiele für HMG-CoA-Reduktasen und HMG-CoA-Reduktase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen,  
 25 deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID NO: 100 leicht auffinden.

30 Weitere Beispiele für HMG-CoA-Reduktasen und HMG-CoA-Reduktase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 99 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter  
 35 Weise leicht auffinden.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die  
 40 Aminosäuresequenz der HMG-CoA-Reduktase der Sequenz SEQ ID NO: 100.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code  
 45 erhältlich.

## 71

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

5

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 99 in den Organismus ein.

- 10 Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 102 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abge-
- 15 leitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 102, und die die enzymatische Eigenschaft einer (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Di-
- 20 phosphat-Reduktase aufweisen.

Weitere Beispiele für (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktasen und (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen

- 25 Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID NO: 102 leicht auffinden.

- 30 Weitere Beispiele für (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktasen und (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 101 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben,
- 35 durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-

- 40 Reduktase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase der Sequenz SEQ ID NO: 102.

## 72

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- 5 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.
- 10 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 101 in den Organismus ein.

- Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter
- 15 Ausführungsform als (1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 104 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise
- 20 mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 104, und die die enzymatische Eigenschaft einer (1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase aufweisen.
- 25 Weitere Beispiele für (1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthasen und (1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche
- 30 der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID NO: 104 leicht auffinden.

- Weitere Beispiele für (1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthasen und
- 35 (1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 103 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.
- 40 In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der (1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der (1-Deoxy-D-Xylose-5-Phos-
- 45 phat-Synthase der Sequenz SEQ ID NO: 104.

## 73

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- 5 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.
- 10 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 103 in den Organismus ein.

- Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter
- 15 Ausführungsform als 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 106 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise
- 20 mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 106, und die die enzymatische Eigenschaft einer 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase aufweisen.
- 25 Weitere Beispiele für 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerasen und 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben,
- 30 durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID NO: 106 leicht auffinden.

- Weitere Beispiele für 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerasen und 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Gene
- 35 lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 105 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise
- 40 leicht auffinden.

- In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine
- 45 kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase der Sequenz SEQ ID NO: 106.



## 74

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- 5 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.
- 10 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 105 in den Organismus ein.

- Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter
- 15 Ausführungsform als Isopentenyl-D-Isomerase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 108 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, 20 bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 108, und die die enzymatische Eigenschaft einer Isopentenyl-D-Isomerase aufweisen.
- 25 Weitere Beispiele für Isopentenyl-D-Isomerasen und Isopentenyl-D-Isomerase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus 30 Datenbanken mit der Seq ID NO: 108 leicht auffinden.

- Weitere Beispiele für Isopentenyl-D-Isomerasen und Isopentenyl-D-Isomerase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 107 aus verschiedenen Organismen deren 35 genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

- In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur 40 Erhöhung der Isopentenyl-D-Isomerase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Isopentenyl-D-Isomerase der Sequenz SEQ ID NO: 108.

## 75

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- 5 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.
- 10 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 107 in den Organismus ein.

- Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter
- 15 Ausführungsform als Geranyl-Diphosphat-Synthase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 110 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %,
- 20 bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 110, und die die enzymatische Eigenschaft einer Geranyl-Diphosphat-Synthase aufweisen.
- 25 Weitere Beispiele für Geranyl-Diphosphat-Synthasen und Geranyl-Diphosphat-Synthase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäure-
- 30 sequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID NO: 110 leicht auffinden.

- Weitere Beispiele für Geranyl-Diphosphat-Synthasen und Geranyl-Diphosphat-Synthase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise
- 35 ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 109 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.
- 40 In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Geranyl-Diphosphat-Synthase der Sequenz SEQ ID NO: 110.

## 76

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- 5 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.
- 10 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 109 in den Organismus ein.

- Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter
- 15 Ausführungsform als Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 112 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %,
- 20 bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 112, und die die enzymatische Eigenschaft einer Farnesyl-Diphosphat-Synthase aufweisen.
- 25 Weitere Beispiele für Farnesyl-Diphosphat-Synthasen und Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäure-
- 30 sequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID NO: 112 leicht auffinden.

- Weitere Beispiele für Farnesyl-Diphosphat-Synthasen und Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise
- 35 ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 111 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

- 40 In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Farnesyl-Diphosphat-Synthase der Sequenz SEQ ID NO: 112.

## 77

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- 5 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.
- 10 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 111 in den Organismus ein.

- Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter
- 15 Ausführungsform als Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 114 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise
- 20 mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 114, und die die enzymatische Eigenschaft einer Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase aufweisen.
- 25 Weitere Beispiele für Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthasen und Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche
- 30 der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID NO: 114 leicht auffinden.

- Weitere Beispiele für Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthasen und
- 35 Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 113 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

- 40 In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Geranyl-geranyl-Diphosphat-
- 45 Synthase der Sequenz SEQ ID NO: 114.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- 5 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.
- 10 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 113 in den Organismus ein.

- Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Phytoen-Synthase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 116 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, 20 bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 116, und die die enzymatische Eigenschaft einer Phytoen-Synthase aufweisen.
- 25 Weitere Beispiele für Phytoen-Synthasen und Phytoen-Synthase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken 30 mit der Seq ID NO: 116 leicht auffinden.

- Weitere Beispiele für Phytoen-Synthasen und Phytoen-Synthase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 115 aus verschiedenen Organismen deren genomische 35 Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

- In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden 40 zur Erhöhung der Phytoen-Synthase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Phytoen-Synthase der Sequenz SEQ ID NO: 116.

## 79

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- 5 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.
- 10 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 115 in den Organismus ein.

- Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter
- 15 Ausführungsform als Phytoen-Desaturase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 118 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %,
- 20 bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 118, und die die enzymatische Eigenschaft einer Phytoen-Desaturase aufweisen.
- 25 Weitere Beispiele für Phytoen-Desaturasen und Phytoen-Desaturase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken
- 30 mit der Seq ID NO: 118 leicht auffinden.

- Weitere Beispiele für Phytoen-Desaturasen und Phytoen-Desaturase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 117 aus verschiedenen Organismen deren
- 35 genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

- In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden
- 40 zur Erhöhung der Phytoen-Desaturase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Phytoen-Desaturase der Sequenz SEQ ID NO: 118.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- 5 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.
- 10 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 117 in den Organismus ein.

- Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter
- 15 Ausführungsform als Zeta-Carotin-Desaturase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 120 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %,
- 20 bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 120, und die die enzymatische Eigenschaft einer Zeta-Carotin-Desaturase aufweisen.

- 25 Weitere Beispiele für Zeta-Carotin-Desaturasen und Zeta-Carotin-Desaturase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen
- 30 aus Datenbanken mit der SEQ ID NO: 120 leicht auffinden.

- Weitere Beispiele für Zeta-Carotin-Desaturasen und Zeta-Carotin-Desaturase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 119 aus verschiedenen Organismen deren
- 35 genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

- In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur
- 40 Erhöhung der Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Zeta-Carotin-Desaturase der Sequenz SEQ ID NO: 120.

## 81

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- 5 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.
- 10 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 119 in den Organismus ein.

- Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter
- 15 Ausführungsform als CrtISO-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 122 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten
- 20 mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 122, und die die enzymatische Eigenschaft einer CrtIso aufweisen.

- Weitere Beispiele für CrtISO und CrtISO-Gene lassen sich
- 25 beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID NO: 122 leicht auffinden.
- 30 Weitere Beispiele für CrtISO und CrtISO-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 121 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-
- 35 Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

- In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der CrtISO-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz
- 40 der CrtISO der Sequenz SEQ ID NO: 122.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.



## 82

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

5

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 121 in den Organismus ein.

- 10 Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als FtsZ-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 124 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von
- 15 mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 124, und die die enzymatische Eigenschaft einer FtsZ aufweisen.

20

Weitere Beispiele für FtsZn und FtsZ-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rück-

25 übersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID NO: 124 leicht auffinden.

- Weitere Beispiele für FtsZn und FtsZ-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 123 aus ver-
- 30 schiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

- In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden
- 35 zur Erhöhung der FtsZ-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der FtsZ der Sequenz SEQ ID NO: 124

- Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rück-
- 40 übersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die
- 45 codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 123 in den Organismus ein.

- 5 Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als MinD-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 126 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von
- 10 mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 126, und die die enzymatische Eigenschaft einer MinD aufweisen.

15

Weitere Beispiele für MinDn und MinD-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten

- 20 Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID NO: 126 leicht auffinden.

Weitere Beispiele für MinDn und MinD-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 125 aus ver-

- 25 schiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur

30 Erhöhung der MinD-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der MinD der Sequenz SEQ ID NO: 126.

- Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rück-
- 35 übersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die
- 40 codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

- In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 125 in den
- 45 Organismus ein.

Alle vorstehend erwähnten HMG-CoA-Reduktase-Gene, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Gene, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Gene, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Gene, Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Gene, Geranyl-5 Diphosphat-Synthase-Gene, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Gene, Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Gene, Phytoen-Synthase-Gene, Phytoen-Desaturase-Gene, Zeta-Carotin-Desaturase-Gene, crtISO-Gene, FtsZ-Gene oder MinD-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen 10 wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) 15 erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben. 20

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens weisen die Pflanzen gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase Aktivität auf.

25 Unter einer reduzierten Aktivität wird, wie vorstehend erwähnt, vorzugsweise die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Funktionalität eines Enzyms in einer 30 pflanzlichen Zelle, Pflanze oder einem davon abgeleiteten Teil, Gewebe, Organ, Zellen oder Samen verstanden.

Die Reduzierung einer Aktivität in Pflanzen gegenüber dem Wildtyp kann beispielsweise durch Reduzierung der Proteinmenge, oder der 35 mRNA-Menge in der Pflanze erfolgen. Dementsprechend kann eine gegenüber dem Wildtyp reduzierte Aktivität direkt bestimmt werden oder über die Bestimmung der Proteinmenge oder der mRNA-Menge der erfindungsgemäßen Pflanze im Vergleich zum Wildtyp erfolgen.

40 Eine Reduzierung einer Aktivität umfasst eine mengenmäßige Verringerung eines Proteins bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen des Proteins (d.h. fehlende Nachweisbarkeit der entsprechenden Aktivität oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit des entsprechenden Proteins).

## 85

Unter endogener  $\beta$ -Hydroxylase -Aktivität wird die Enzymaktivität der endogenen, pflanzeneigenen  $\beta$ -Hydroxylase verstanden.

Unter einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase wird eine endogene, pflanzen-  
5 eigene Hydroxylase wie vorstehend beschrieben, verstanden. Ist beispielsweise *Tagetes erecta* die genetisch zu verändernde Zielpflanze, so wird unter der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase die  $\beta$ -Hydroxylase von *Tagetes erecta* verstanden.

10 Unter einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase wird demnach insbesondere ein pflanzeneigenes Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter endogener  $\beta$ -Hydroxylase -Aktivität  
15 die in einer bestimmten Zeit durch das Protein endogene  $\beta$ -Hydroxylase umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin bzw. gebildete Menge Zeaxanthin verstanden.

Bei einer reduzierten endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität gegen-  
20 über dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit die durch das Protein endogene  $\beta$ -Hydroxylase umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin bzw. die gebildete Menge Zeaxanthin reduziert.

25 Vorzugsweise beträgt diese Reduzierung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt 100 %. Besonders bevorzugt ist die endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität komplett ausgeschaltet.

30

Es wurde überraschenderweise gefunden, dass es bei Pflanzen die  
mehrheitlich Carotinoide des  $\alpha$ -Carotin-Weges, wie beispielsweise  
Lutein, herstellen, wie beispielsweise Pflanzen der Gattung  
*Tagetes*, vorteilhaft ist, die Aktivität der endogenen  $\beta$ -Hydroxy-  
35 lase zu reduzieren und gegebenenfalls die Aktivität einer heterologen Hydroxylase zu erhöhen. Besonders bevorzugt werden dabei Hydroxylasen oder funktionelle Äquivalente davon verwendet, die aus Pflanzen stammen, die mehrheitlich Carotinoide des  $\beta$ -Carotin-Weges herstellen, wie beispielsweise die vorstehend beschriebene  
40  $\beta$ -Hydroxylase aus Tomate (Nukleinsäure: SEQ ID No. 97, Protein: SEQ ID No. 98).

Die Bestimmung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Aktivität erfolgt  
wie vorstehend beschrieben analog zur Bestimmung der Hydroxylase-  
45 Aktivität.

## 86

Vorzugsweise erfolgt die Reduzierung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität in Pflanzen durch mindestens eines der nachfolgenden Verfahren:

- 5 a) Einbringen mindestens einer doppelsträngigen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch endogene  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA genannt, oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten.
- 10 Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die endogene  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA gegen ein endogenes  $\beta$ -Hydroxylase-Gen (also genomische DNA-Sequenzen wie die Promotorsequenz) oder ein endogenes  $\beta$ -Hydroxylase-Transkript (also mRNA-Sequenzen)
- 15 gerichtet ist,
- b) Einbringen mindestens einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase anti-sense-Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch endogene  $\beta$ -Hydroxylase-antisenseRNA genannt, oder einer deren
- 20 Expression gewährleistenden Expressionskassette. Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die endogene  $\beta$ -Hydroxylase-antisenseRNA gegen ein endogenes  $\beta$ -Hydroxylase-Gen (also genomische DNA-Sequenzen) oder ein endogenes  $\beta$ -Hydroxylase-Gentranskript (also RNA-Sequenzen) gerichtet ist. Umfasst
- 25 sind auch  $\alpha$ -anomere Nukleinsäuresequenzen,
- c) Einbringen mindestens einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-antisenseRNA kombiniert mit einem Ribozym oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 30 d) Einbringen mindestens einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase sense-Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch endogene  $\beta$ -Hydroxylase-senseRNA genannt, zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 35 e) Einbringen mindestens eines DNA- oder Protein-bindenden Faktors gegen ein endogenes  $\beta$ -Hydroxylase-Gen, -RNA oder -Protein oder einer dessen Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 40 f) Einbringen mindestens einer, den endogenen  $\beta$ -Hydroxylase RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 45 g) Einbringen mindestens eines Konstruktes zur Erzeugung eines Funktionsverlustes, wie beispielsweise die Generierung von Stopp-Kodons oder eine Verschiebungen im Leseraster,

an einem endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Gen beispielsweise durch Erzeugung einer Insertion, Deletion, Inversion oder Mutation in einem endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Gen. Bevorzugt können Knock-out-Mutanten mittels gezielter Insertion in besagtes endogenes  $\beta$ -Hydroxylase-Gen durch homologe Rekombination oder Einbringen von sequenzspezifischen Nukleasen gegen endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Gensequenzen generiert werden.

Dem Fachmann ist bekannt, dass auch weitere Verfahren im Rahmen der vorliegenden Erfindung zur Verminderung einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase bzw. seiner Aktivität oder Funktion eingesetzt werden können. Beispielsweise kann auch das Einbringen einer dominant-negativen Variante einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette vor- teilhaft sein. Dabei kann jedes einzelne dieser Verfahren eine Verminderung der Proteinmenge, mRNA-Menge und/oder Aktivität einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase bewirken. Auch eine kombinierte Anwendung ist denkbar. Weitere Methoden sind dem Fachmann bekannt und können die Behinderung oder Unterbindung der Prozessierung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase, des Transports der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase oder dessen mRNA, Hemmung der Ribosomenanlagerung, Hemmung des RNA-Spleißens, Induktion eines endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-RNA abbauenden Enzyms und/oder Hemmung der Translationselongation oder -termination umfassen.

Die einzelnen bevorzugten Verfahren seien infolge durch beispielhafte Ausführungsformen beschrieben:

- a) Einbringen einer doppelsträngigen, endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Ribonukleinsäuresequenz (endogene  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA)

Das Verfahren der Genregulation mittels doppelsträngiger RNA wurde vorstehend für die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität ausführlich beschrieben. Analog lässt sich dieses Verfahren für die Reduzierung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität durchführen.

Unter einer doppelsträngigen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Ribonukleinsäuresequenz oder auch endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA wird vorzugsweise ein RNA-Molekül verstanden, das einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

- a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Transkripts identisch ist und/oder

- b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Promotor-Sequenz identisch ist.

Im erfindungsgemäßen Verfahren bringt man daher zur Reduzierung  
5 der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität bevorzugt in die Pflanze eine RNA ein, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

- a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen endogenen  
10  $\beta$ -Hydroxylase-Transkripts identisch ist und/oder

- b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Promotor-Sequenz identisch ist.

15 Unter dem Begriff „endogenes  $\beta$ -Hydroxylase-Transkript“ wird der transkripierte Teil eines endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Gens verstanden, der neben der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase kodierenden Sequenz beispielsweise auch nichtkodierende Sequenzen, wie beispielsweise auch UTRs enthält.

20

Unter einer RNA, die „mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Promotor-Sequenz identisch ist“, ist vorzugsweise gemeint, dass die RNA-Sequenz mit mindestens einem Teil des theoretischen Transkriptes der endogenen  $\beta$ -Hydroxy-  
25 lase-Promotor-Sequenz, also der entsprechenden RNA-Sequenz, identisch ist.

Unter „einem Teil“ des Pflanze eigenen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Transkripts bzw. der Pflanze eigenen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Pro-  
30 motor-Sequenz werden Teilsequenzen verstanden, die von wenigen Basenpaaren bis hin zu vollständigen Sequenzen des Transkripts bzw. der Promotorsequenz reichen können. Die optimale Länge der Teilsequenzen kann der Fachmann durch Routineversuche leicht ermitteln.

35

In der Regel beträgt die Länge der Teilsequenzen mindestens 10 Basen und höchstens 2 kb, bevorzugt mindestens 25 Basen und höchstens 1,5 kb, besonders bevorzugt mindestens 50 Basen und höchstens 600 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens  
40 100 Basen und höchstens 500, am meisten bevorzugt mindestens 200 Basen oder mindestens 300 Basen und höchstens 400 Basen.

Vorzugsweise werden die Teilsequenzen so ausgesucht, dass eine möglichst hohe Spezifität erreicht wird und nicht Aktivitäten  
45 anderer Enzyme reduziert werden, deren Verminderung nicht erwünscht ist. Es ist daher vorteilhaft für die Teilsequenzen der der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA Teile des endogenen  $\beta$ -Hydroxy-

lase Transkripts und/oder Teilsequenzen der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Promotor-Sequenzen zu wählen, die nicht in anderen Aktivitäten auftreten.

- 5 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält daher die endogene  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA eine Sequenz, die mit einem Teil des Pflanze eigenen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Transkripts identisch ist und das 5'-Ende oder das 3'-Ende der Pflanze eigenen Nukleinsäure, kodierend eine endogene  $\beta$ -Hydroxylase enthält. Insbesondere  
10 sind nichttranslatierte Bereiche im 5' oder 3' des Transkriptes geeignet, selektive Doppel-Strang-Strukturen herzustellen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung bezieht sich auf doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA-Moleküle), die bei Einbringen in  
15 einen pflanzlichen Organismus (oder eine davon abgeleitete Zelle, Gewebe, Organ oder Vermehrungsmaterial) die Verminderung einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase bewirken.

Ferner betrifft die Erfindung ein doppelsträngiges RNA-Molekül  
20 zur Reduzierung der Expression einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase (endogene  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA) umfassend dabei bevorzugt

- a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil eines "sense"-RNA-endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Transkriptes, und  
25  
b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen, bevorzugt vollständig, komplementären ist.  
30

Zur Transformation der Pflanze mit einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA wird bevorzugt ein Nukleinsäurekonstrukt verwendet, das in die Pflanze eingebracht wird und das in der Pflanze in die endogene  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA transkribiert wird.  
35

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Nukleinsäurekonstrukt, transkribierbar in

- 40 a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-endogene  $\beta$ -Hydroxylase Transkriptes, und  
45 b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementär ist.



## 90

Diese Nukleinsäurekonstrukte werden im folgenden auch Expressionskassetten oder Expressionsvektoren genannt.

In Bezug auf die dsRNA-Moleküle wird unter der endogenen  
5  $\beta$ -Hydroxylase Nukleinsäuresequenz, bzw. das entsprechende Transkript bevorzugt die Sequenz gemäß SEQ ID NO: 127 oder ein Teil derselben verstanden.

"Im wesentlichen identisch" meint, dass die dsRNA Sequenz auch  
10 Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Zielsequenz aufweisen kann und dennoch eine effizient Verminderung der Expression bewirkt. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 75 %, bevorzugt mindestens 80 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 90 % am meisten  
15 bevorzugt 100 % zwischen dem "sense"-Strang einer inhibitorischen dsRNA und mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes eines endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Gens, bzw. zwischen dem "antisense"-Strang dem komplementären Strang eines endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Gens.

20

Eine 100%ige Sequenzidentität zwischen dsRNA und einem endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Gentranskript ist nicht zwingend erforderlich, um eine effiziente Verminderung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Expression zu bewirken. Demzufolge besteht der Vorteil, dass das  
25 Verfahren tolerant ist gegenüber Sequenzabweichungen, wie sie infolge genetischer Mutationen, Polymorphismen oder evolutionärer Divergenzen vorliegen können. So ist es beispielsweise möglich mit der dsRNA, die ausgehend von der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Sequenz des einen Organismus generiert wurde, die endogene  
30  $\beta$ -Hydroxylase Expression in einem anderen Organismus zu unterdrücken. Zu diesem Zweck umfasst die dsRNA bevorzugt Sequenzbereiche von endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Gentranskripten, die konservierten Bereichen entsprechen. Besagte konservierte Bereiche können aus Sequenzvergleichen leicht abgeleitet werden.

35

Alternativ, kann eine "im wesentlichen identische" dsRNA auch als Nukleinsäuresequenz definiert werden, die befähigt ist, mit einem Teil eines endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Gentranskriptes zu hybridisieren (z.B. in 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6,4, 1 mM EDTA bei  
40 50°C oder 70°C für 12 bis 16 h).

"Im wesentlichen komplementär" meint, dass der "antisense"-RNA-Strang auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges  
45 aufweisen kann. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 80 %, bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt mindestens

95 %, am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "antisense"-RNA-Strang und dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges.

In einer weiteren Ausführungsform umfasst die endogene  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA

- 10 a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes des Promotorbereichs eines endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Gens, und
- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementären ist.

15

Das entsprechende, bevorzugt zur Transformation der Pflanzen zu verwendende, Nukleinsäurekonstrukt, umfasst

- 20 a) einen "sense"-DNA-Strang der im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des Promotorbereichs eines endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Gens, und
- b) einen "antisense"-DNA-Strang, der zu dem DNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementär ist.

25

Zur Herstellung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Sequenzen zur Reduzierung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität werden, insbesondere für *Tagetes erecta*, besonders bevorzugt die folgenden Teils-

30 Sequenzen verwendet:

SEQ ID NO: 163: Sense-Fragment der 5'terminalen Region der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase

35 SEQ ID NO: 164: Antisense-Fragment der 5'terminalen Region der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase

Die dsRNA kann aus einem oder mehr Strängen von Polyribonukleotiden bestehen. Natürlich können, um den gleichen Zweck

40 zu erreichen, auch mehrere individuelle dsRNA Moleküle, die jeweils einen der oben definierten Ribonukleotidsequenzabschnitte umfassen, in die Zelle oder den Organismus eingebracht werden.

Die doppelsträngige dsRNA-Struktur kann ausgehend von zwei kom-

45 plementären, separaten RNA-Strängen oder - bevorzugt - ausgehend von einem einzelnen, selbstkomplementären RNA-Strang gebildet werden. In diesem Fall sind "sense"-RNA-Strang und "anti-

## 92

sense"-RNA-Strang bevorzugt kovalent in Form eines invertierten "Repeats" miteinander verbunden.

Wie z.B. in WO 99/53050 beschrieben, kann die dsRNA auch eine  
5 Haarnadelstruktur umfassen, indem "sense"- und "antisense"-Strang durch eine verbindende Sequenz ("Linker"; beispielsweise ein Intron) verbunden werden. Die selbstkomplementären dsRNA-Strukturen sind bevorzugt, da sie lediglich die Expression einer RNA-Sequenz erfordern und die komplementären RNA-Stränge stets in einem  
10 äquimolaren Verhältnis umfassen. Bevorzugt ist die verbindende Sequenz ein Intron (z.B. ein Intron des ST-LS1 Gens aus Kartoffel; Vancanneyt GF et al. (1990) Mol Gen Genet 220(2):245-250).

Die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine dsRNA kann weitere  
15 Elemente beinhalten, wie beispielsweise Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungssignale.

Weitere bevorzugte Ausführungsformen für die Reduzierung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Aktivität ergeben sich analog der vor-  
20 stehend beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen der Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität unter Austausch der  $\epsilon$ -Cyclase durch endogene  $\beta$ -Hydroxylase.

Besonders bevorzugt werden im erfindungsgemäßen Verfahren gene-  
25 tisch veränderte Pflanzen mit folgende Kombinationen genetischer Veränderungen verwendet:

Genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und  
30 eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen,  
35

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

40 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

## 93

- genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen,
- 5 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen, sowie
- 10 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen.
- 15 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen,
- 20 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität aufweisen,
- 25 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen,
- 30 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen,
- 35 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität aufweisen,
- 40 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen,
- 45 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität und mindestens eine weitere

erhöhte Aktivität, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Iso-  
5 pentenyl-Diphosphat-D-Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Phytoen-Synthase-Aktivität, Phytoen-Desaturase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität  
10 aufweisen.

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-  
15 Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-  
20 Aktivität und eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-  
25 Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-  
30 Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität aufweisen.  
35

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität aufweisen,  
40

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte Hydroxylase-  
45

Aktivität und eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine  
5 erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern,  
eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und mindestens eine weitere erhöhte Aktivität, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität, 1-Deoxy-D-  
10 Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Phytoen-Synthase-Aktivität, Phytoen-Desaturase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität aufweisen.

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern,  
20 eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine  
25 erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine  
30 erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

35 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und mindestens eine weitere erhöhte Aktivität, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Phytoen-Synthase-Aktivität, Phytoen-Desaturase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität aufweisen.

rase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine  
 5 erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern,  
 eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine reduzierte endogene  
 b-Hydroxylase-Aktivität und mindestens eine weitere erhöhte  
 Aktivität, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität,  
 (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität,  
 10 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose  
 -5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-Diphosphat-D-  
 Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Far-  
 nesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Diphosphat-  
 Synthase-Aktivität, Phytoen-Synthase-Aktivität, Phytoen-Desa-  
 15 turase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-  
 Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine  
 erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern,  
 20 eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte Hydroxylase-  
 Aktivität und mindestens eine weitere erhöhte Aktivität, ausge-  
 wählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, (E)-4-Hydroxy-  
 3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität, 1-Deoxy-D-  
 Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-  
 25 Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-Diphosphat-  
 $\Delta$ -Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität,  
 Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Diphos-  
 phat-Synthase-Aktivität, Phytoen-Synthase-Aktivität, Phytoen-  
 Desaturase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-  
 30 Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine  
 erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern,  
 eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität, eine reduzierte endogene  
 35  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität und mindestens eine weitere erhöhte  
 Aktivität, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität,  
 (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität,  
 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-  
 D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-  
 40 Diphosphat-D-Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-  
 Aktivität, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-  
 Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Phytoen-Synthase-Aktivi-  
 tät, Phytoen-Desaturase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-  
 Aktivität, crtISO-Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität  
 45 aufweisen,

## 97

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine reduzierte  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und mindestens eine weitere erhöhte Aktivität, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Phytoen-Synthase-Aktivität, Phytoen-Desaturase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität, eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität und mindestens eine weitere erhöhte Aktivität, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Phytoen-Synthase-Aktivität, Phytoen-Desaturase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität aufweisen.

Besonders bevorzugte, genetisch veränderte Pflanzen, weisen im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität auf, wobei

die erhöhte Ketolase Aktivität dadurch verursacht wird, dass man Nukleinsäuren einbringt, die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäure-



## 98

ebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist,

die erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität dadurch verursacht wird, dass man  
5 Nukleinsäure einbringt, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 96 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 20 aufweist

10

und die erhöhte Hydroxylase-Aktivität dadurch verursacht wird, dass man Nukleinsäuren einbringt, kodierend eine Hydroxylase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 98 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von  
15 Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 18 aufweist.

Besonders bevorzugte, genetisch veränderte Pflanzen, weisen im  
20 Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\varepsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität auf, wobei

25

die erhöhte Ketolase Aktivität dadurch verursacht wird, dass man Nukleinsäuren einbringt, die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete  
30 Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist,

die erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität dadurch verursacht wird, dass man  
35 Nukleinsäure einbringt, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 96 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 20 aufweist,

40

die erhöhte Hydroxylase-Aktivität dadurch verursacht wird, dass man Nukleinsäuren einbringt, kodierend eine Hydroxylase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 98 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens  
45 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 18 aufweist, und die reduzierte  $\varepsilon$ -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte endo-

## 99

gene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität gemäß den vorstehend beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen verursacht wird.

Die Herstellung dieser genetisch veränderten Pflanzen kann, wie  
5 nachstehend beschrieben, beispielsweise durch Einbringen einzelner Nukleinsäurekonstrukte (Expressionskassetten) oder durch Einbringen von Mehrfachkonstrukten erfolgen, die bis zu zwei, drei oder vier der beschriebenen Aktivitäten enthalten.

10 Im erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden wird vorzugsweise dem Kultivierungsschritt der genetisch veränderten Pflanzen, im folgenden auch transgene Pflanzen bezeichnet, ein Ernten der Pflanzen und ein Isolieren von Ketocarotinoiden aus den Blütenblättern der Pflanzen angeschlossen.

15

Die transgenen Pflanzen werden in an sich bekannter Weise auf Nährböden gezogen und entsprechend geerntet.

Die Isolierung von Ketocarotinoiden aus den geernteten Blüten-  
20 blättern erfolgt in an sich bekannter Weise, beispielsweise durch Trocknung und anschließender Extraktion und gegebenenfalls weiterer chemischer oder physikalischer Reinigungsprozesse, wie beispielsweise Fällungsmethoden, Kristallographie, thermische Trennverfahren, wie Rektifizierverfahren oder physikalische  
25 Trennverfahren, wie beispielsweise Chromatographie. Die Isolierung von Ketocarotinoiden aus den Blütenblättern erfolgt beispielsweise bevorzugt durch organische Lösungsmittel wie Aceton, Hexan, Ether oder tert.-Methylbutylether.

30 Weitere Isolierverfahren von Ketocarotinoiden, insbesondere aus Blütenblättern, sind beispielsweise in Egger und Kleinig (Phytochemistry (1967) 6, 437-440) und Egger (Phytochemistry (1965) 4, 609-618) beschrieben.

35 Vorzugsweise sind die Ketocarotinoide ausgewählt aus der Gruppe Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin.

Ein besonders bevorzugtes Ketocarotinoid ist Astaxanthin.

40

Die Ketocarotinoide fallen im erfindungsgemäßen Verfahren in Blütenblättern in Form ihrer Mono- oder Diester mit Fettsäuren an. Einige nachgewiesene Fettsäuren sind z.B. Myristinsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure, Ölsäure, Linolensäure, und Laurin-  
45 säure (Kamata und Simpson (1987) Comp. Biochem. Physiol. Vol. 86B(3), 587-591).

## 100

Im folgenden wird exemplarisch die Herstellung genetisch veränderter Pflanzen mit erhöhter oder verursachter Ketolase-Aktivität in Blütenblättern beschrieben. Die Erhöhung weiterer Aktivitäten, wie beispielsweise der Hydroxylase-Aktivität und/oder der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und/oder der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und/oder der (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität und/oder der 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität und/oder der 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität und/oder der Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Aktivität und/oder der Granyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität und/oder der Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität und/oder der Geranylgeranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität und/oder der Phytoen-Synthase-Aktivität und/oder der Phytoen-Desaturase-Aktivität und/oder der Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität und/oder der crtISO-Aktivität und/oder der FtsZ-Aktivität und/oder der MinD-Aktivität kann analog unter Verwendung von Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Hydroxylase bzw.  $\beta$ -Cyclase bzw. Nukleinsäuren kodierend eine HMG-CoA-Reduktase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Geranylgeranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Desaturase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase und/oder Nukleinsäuren kodierend ein crtIso-Protein und/oder Nukleinsäuren kodierend ein FtsZ-Protein und/oder Nukleinsäuren kodierend ein MinD-Protein anstelle von Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Ketolase erfolgen. Die Reduzierung weiterer Aktivitäten, wie beispielsweise die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität bzw. der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität kann analog unter Verwendung von anti- $\epsilon$ -Cyclase-Nukleinsäuresequenzen oder  $\epsilon$ -Cyclase-Inverted-Repeat-Nukleinsäuresequenz bzw. unter Verwendung von anti-endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Nukleinsäuresequenzen oder endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Inverted-Repeat-Nukleinsäuresequenzen anstelle von Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Ketolase erfolgen. Die Transformation kann bei den Kombinationen von genetischen Veränderungen einzeln oder durch Mehrfachkonstrukte erfolgen.

Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgt vorzugsweise durch Transformation der Ausgangspflanzen, mit einem Nukleinsäurekonstrukt, das die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren kodierend eine Ketolase enthält, die mit einem oder mehreren

## 101

Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.

Diese Nukleinsäurekonstrukte, in denen die kodierende Nukleinsäuresequenz mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten, werden im folgenden auch Expressionskassetten genannt.

- 10 Die Erfindung betrifft weiterhin Nukleinsäurekonstrukte enthaltend mindestens eine Nukleinsäure kodierend eine Ketolase und zusätzlich mindestens eine weitere Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe
- a) Nukleinsäuren kodierend eine  $\beta$ -Cyclase,
  - 15 b) Nukleinsäuren kodierend eine  $\beta$ -Hydroxylase,
  - c) Nukleinsäuren kodierend eine HMG-CoA-Reduktase,
  - d) Nukleinsäuren kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase
  - e) Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-
  - 20 Synthase, f) Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase,
  - g) Nukleinsäuren kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase,
  - h) Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase,
  - 25 i) Nukleinsäuren kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase,
  - j) Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase,
  - k) Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Synthase,
  - l) Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Desaturase,
  - 30 m) Nukleinsäuren kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase,
  - n) Nukleinsäuren kodierend ein crtISO Protein,
  - o) Nukleinsäuren kodierend ein FtsZ Protein,
  - p) Nukleinsäuren kodierend ein MinD Protein,
  - q) doppelsträngige endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Ribonukleinsäuresequenz und/oder endogene  $\beta$ -Hydroxylase antisense-Ribonukleinsäuresequenzen und
  - 35 r) doppelsträngige  $\epsilon$ -Cyclase- Ribonukleinsäuresequenz und/oder  $\epsilon$ -Cyclase antisense-Ribonukleinsäuresequenz,
- wobei die Nukleinsäuren mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.
- 40

Es ist, insbesondere in Pflanzen, technisch nur schwer zu realisieren, mehr als vier Aktivitäten mit einem Nukleinsäurekonstrukt zu erhöhen oder zu erniedrigen. Daher werden bevorzugt Kombinationen von Nukleinsäurekonstrukten verwendet um die Aktivi-

45

## 102

täten, insbesondere um mehr als 4 Aktivitäten im Organismus zu erhöhen oder zu erniedrigen.

Es ist jedoch auch möglich, genetisch veränderte Organismen zu  
 5 kreuzen, die bereits veränderte Aktivitäten enthalten. Beispiels-  
 weise ist es durch Kreuzen von genetisch veränderten Organismen,  
 die jeweils zwei veränderte Aktivitäten enthalten, möglich,  
 Organismen mit vier veränderten Aktivitäten herzustellen.  
 Gleiches kann auch erreicht werden, indem man eine Kombination  
 10 von zwei Nukleinsäurekonstrukten die jeweils 2 Aktivitäten ver-  
 ändern in den Organismus einführt.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die bevorzugten  
 genetisch veränderten Organismen durch Einbringen von Kombi-  
 15 nationen von Nukleinsäurekonstrukten hergestellt.

Bevorzugte erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukte enthalten  
 folgende Kombinationen von Nukleinsäuren mit einem oder mehreren  
 Regulationssignalen funktionell verknüpft, die die Transkription  
 20 und Translation in Pflanzen gewährleisten:

Ketolase + epsilon  
 Ketolase + beta  
 Ketolase + hydro (OEX)  
 25 Ketolase + epsilon + beta  
 Ketolase + epsilon + hydro (RNAi)  
 Ketolase + epsilon + hydro (OEX)  
 Ketolase + beta + hydro (RNAi)  
 Ketolase + beta + hydro (OEX)  
 30 Ketolase + epsilon + (xxx)  
 Ketolase + epsilon + beta + hydro (OEX)  
 Ketolase + epsilon + beta + hydro (RNAi)  
 Ketolase+ epsilon + beta  
 Ketolase + epsilon + hydro (OEX)  
 35 Ketolase + epsilon + hydro (RNAi)  
 Ketolase + epsilon + hydro (OEX) + hydro (RNAi)  
 Ketolase + beta + hydro (OEX) + hydro (RNAi)  
 Ketolase+ epsilon + beta + (xxx)  
 Ketolase + epsilon + beta + hydro (OEX) + hydro (RNAi)  
 40 Ketolase + epsilon + beta + hydro (OEX)  
 Ketolase + epsilon + beta + hydro (RNAi)  
 Ketolase + epsilon + hydro (RNAi) + (xxx)  
 Ketolase + epsilon + hydro (OEX) + (xxx)  
 Ketolase + beta + hydro (RNAi) + (xxx)  
 45 Ketolase + beta + hydro (OEX) + (xxx)  
 Ketolase + epsilon + beta + hydro (OEX) + hydro (RNAi)  
 Ketolase + epsilon + beta + hydro (OEX) + (xxx)

## 103

Ketolase + epsilon + beta + hydro (RNAi) + (xxx),

wobei die Abkürzungen folgende Bedeutung haben:

- 5 Ketolase: Nukleinsäuren kodierend eine Ketolase  
 beta: Nukleinsäuren kodierend eine  $\beta$ -Cyclase  
 hxdro (OEX): Expression von Nukleinsäuren kodierend eine  $\beta$ -Hydroxylase  
 hydro (RNAi): doppelsträngige endogene  $\beta$ -Hydroxylase Ribo-  
 10 nukleinsäuresequenz und/oder endogene  $\beta$ -Hydroxy-  
 lase antisense-Ribonukleinsäuresequenzen  
 epsilon: doppelsträngige  $\epsilon$ -Cyclase- Ribonukleinsäuresequenz  
 und/oder  $\epsilon$ -Cyclase antisense-Ribonukleinsäure-  
 sequenz  
 15 (xxx): mindestens eine Nukleinsäure ausgewählt aus Gruppe  
 Nukleinsäuren kodierend eine HMG-CoA-Reduktase,  
 Nukleinsäuren kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-  
 Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase, Nuklein-  
 säuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-  
 20 Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-  
 D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase, Nuklein-  
 säuren kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat-  
 $\Delta$ -Isomerase, Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-  
 Diphosphat-Synthase, Nukleinsäuren kodierend  
 25 eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase, Nukleinsäuren  
 kodierend eine Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Syn-  
 thase, Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Syn-  
 thase, Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Desa-  
 turase, Nukleinsäuren kodierend eine Zeta-Carotin-  
 30 Desaturase, Nukleinsäuren kodierend ein crtISO  
 Protein, Nukleinsäuren kodierend ein FtsZ Protein  
 und Nukleinsäuren kodierend ein MinD Protein.

- Vorzugsweise enthalten die Regulationssignale einen oder mehrere  
 35 Promotoren, die die Transkription und Translation in Pflanzen  
 gewährleisten.

- Die Expressionskassetten beinhalten Regulationssignale, also  
 regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der  
 40 kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevor-  
 zugten Ausführungsform umfasst eine Expressionskassette stromauf-  
 wärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor  
 und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal  
 und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit  
 45 der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für mindestens eines  
 der vorstehend beschriebenen Gene operativ verknüpft sind. Unter  
 einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anord-

## 104

nung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, das jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

5

Im folgenden werden beispielhaft die bevorzugten Nukleinsäurekonstrukte, Expressionskassetten und Vektoren für Pflanzen und Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen, sowie die transgenen Pflanzen selbst beschrieben.

10

Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER),

15 im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).

20 Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann.

"Konstitutiver" Promotor meint solche Promotoren, die eine

25 Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten.

Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294; Odell et al. (1985) Nature 313:810-812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140:281-288; Gardner et al. (1986) Plant Mol Biol 35 6:221-228) oder der 19S CaMV Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202).

Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor ist der pds Promoter (Pecker et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci USA 89:

40 4962-4966) oder der "Rubisco small subunit (SSU)"-Promotor (US 4,962,028), der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-Nr. X03677), der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobacterium, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) Plant 45 Mol Biol 29:637-649), den Ubiquitin 1 Promotor (Christensen et al. (1992) Plant Mol Biol 18:675-689; Bruce et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:9692-9696), den Smas Promotor, den Cinnamyl-

## 105

alkoholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der vakuolärer ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991), der Pnit-Promoter (Y07648.L, Hillebrand et al. (1998), Plant. Mol. Biol. 36, 89-99, 5 Hillebrand et al. (1996), Gene, 170, 197-200, der Ferredoxin-NADPH-Oxidoreductase Promotor (Datenbankeintrag AB011474, Position 70127 bis 69493), der TPT-Promoter (WO 03006660), der „Superpromotor“ (US-Patent 5955646), der 34S-Promotor (US-Patent 6051753) sowie weitere Promotoren von Genen, deren konstitutive 10 Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist.

Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48:89-108), durch den die Expression des Ketolase-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten 15 Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer Promotor (EP 0 388 186), 20 ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J 2:397-404), ein durch Abscisinsäure induzierbarer Promotor (EP 0 335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer Promotor (WO 93/21334) können ebenfalls verwendet werden.

25

Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden wie beispielsweise der pathogen-induzierbare Promotor des PRP1-Gens (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), der hitzeinduzierbare hsp70- oder 30 hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare alpha-Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814), der licht-induzierbare PPK Promotor oder der verwundungsinduzierte pinII-Promoter (EP375091).

35 Pathogen-induzierbare Promotoren umfassen die von Genen, die infolge eines Pathogenbefalls induziert werden wie beispielsweise Gene von PR-Proteinen, SAR-Proteinen, b-1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) Neth J Plant Pathol 89:245-254; Uknes, et al. (1992) The Plant Cell 40 4:645-656; Van Loon (1985) Plant Mol Biol 4:111-116; Marineau et al. (1987) Plant Mol Biol 9:335-342; Matton et al. (1987) Molecular Plant-Microbe Interactions 2:325-342; Somssich et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) Mol Gen Genetics 2:93-98; Chen et al. (1996) Plant J 45 10:955-966; Zhang and Sing (1994) Proc Natl Acad Sci USA



91:2507-2511; Warner, et al. (1993) Plant J 3:191-201; Siebertz et al. (1989) Plant Cell 1:961-968(1989).

Umfasst sind auch verwundungs-induzierbare Promotoren wie der  
5 des pinII Gens (Ryan (1990) Ann Rev Phytopath 28:425-449; Duan et al. (1996) Nat Biotech 14:494-498), des wun1 und wun2-Gens (US 5,428,148), des win1- und win2-Gens (Stanford et al. (1989) Mol Gen Genet 215:200-208), des Systemin (McGurl et al. (1992) Science 225:1570-1573), des WIP1-Gens (Rohmeier et al. (1993)  
10 Plant Mol Biol 22:783-792; Ekelkamp et al. (1993) FEBS Letters 323:73-76), des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) The Plant J 6(2):141-150) und dergleichen.

Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise fruchtreifungs-  
15 spezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtreifungs-spezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794, EP 409 625).  
Entwicklungsabhängige Promotoren schließt zum Teil die gewebe-spezifischen Promotoren ein, da die Ausbildung einzelner Gewebe naturgemäß entwicklungsabhängig erfolgt.

20 Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen beispielsweise die Biosynthese von Ketocarotinoiden bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Bevorzugt sind beispielsweise Promotoren  
25 mit Spezifitäten für die Antheren, Ovarien, Petalen, Sepalen, Blüten, Blätter, Stengel und Wurzeln und Kombinationen hieraus.

Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren sind beispielsweise der Patatin Promotor Klasse I (B33) oder  
30 der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel.

Blattspezifische Promotoren sind beispielsweise der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 97/05900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphat-  
35 carboxylase) oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al. (1989) EMBO J 8:2445-2451).

Blütenspezifische Promotoren sind beispielsweise der Phytoen Synthase Promotor (WO 92/16635), der Promotor des P-rr Gens  
40 (WO 98/22593), der EPSPS-Promotor (Datenbankeintrag M37029), der DFR-A Promotor (Datenbankeintrag X79723), der B-Gen Promotor (WO 0008920) und der CHRC-Promotor (WO 98/24300; Vishnevetsky et al. (1996) Plant J. 10, 1111-1118) sowie die Promotoren der Arabidopsis Gen-Loci At5g33370 (infolge M1 Promoter), At5g22430  
45 (infolge M2 Promoter) und At1g26630 (infolge M3 Promoter).

Antheren-spezifische Promotoren sind beispielsweise der 5126-Promotor (US 5,689,049, US 5,689,051), den glob-1 Promotor oder der g-Zein Promotor.

- 5 Weitere zur Expression in Pflanzen geeignete Promotoren sind beschrieben in Rogers et al. (1987) Methods in Enzymol 153:253-277; Schardl et al. (1987) Gene 61:1-11 und Berger et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:8402-8406).
- 10 Alle in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen Promotoren ermöglichen in der Regel die Expression der Ketolase in Blütenblättern der erfindungsgemäßen Pflanzen.

Besonders bevorzugt im erfindungsgemäßen Verfahren sind konstitu-

15 tive, blütenspezifische und insbesondere blütenblattspezifische Promotoren.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher insbesondere ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen

20 blütenspezifischen oder insbesondere einen blütenblattspezifischen Promotor und eine Nukleinsäure kodierend eine Ketolase.

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt vorzugsweise durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer vorstehend be-

25 schriebenen Nukleinsäure kodierend eine Ketolase und vorzugsweise einer zwischen Promotor und Nukleinsäure-Sequenz inserierten Nukleinsäure, die für ein plastidenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise

30 in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al.,

35 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

Die vorzugsweise insertierte Nukleinsäuren kodierend ein plastidäres Transitpeptid, gewährleisten die Lokalisation in Plastiden

40 und insbesondere in Chromoplasten.

Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren Nukleinsäure-Sequenz für ein Ketolase-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das

45 die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chromoplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Trans-

## 108

lokation der Ketolase in die Chromoplasten vom Ketolase-Teil enzymatisch abgespalten werden.

Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären *Nicotiana tabacum* Transketolase oder einem anderen Transitpeptid (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco (rbcS) oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase als auch der Isopentenylpyrophosphat Isomerase-2) oder dessen funktionellem Äquivalent abgeleitet ist.

10

Besonders bevorzugt sind Nukleinsäure-Sequenzen von drei Kassetten des Plastiden-Transitpeptids der plastidären Transketolase aus Tabak in drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragmente mit einem ATG-Codon in der NcoI Schnittstelle:

15

pTP09

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC  
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCTCACTTTTTCCGGCCTTAA  
20 ATCCAATCCCAATATCACCACTCCCGCCGCGTACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCGTCG  
TAAGGTCACCGGCGATTCTGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGCAGGGA  
TCC\_BamHI

pTP10

25

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC  
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCTCACTTTTTCCGGCCTTAA  
ATCCAATCCCAATATCACCACTCCCGCCGCGTACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCGTCG  
TAAGGTCACCGGCGATTCTGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGCAGT  
30 GATCC\_BamHI

pTP11

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC  
35 CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCTCACTTTTTCCGGCCTTAA  
ATCCAATCCCAATATCACCACTCCCGCCGCGTACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCGTCG  
TAAGGTCACCGGCGATTCTGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGCAGGGA  
ATCC\_BamHI

40 Weitere Beispiele für ein plastidäres Transitpeptid sind das Transitpeptid der plastidären Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) aus *Arabidopsis thaliana* und das Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Ribulosebisphosphat Carboxylase (rbcS) aus Erbse (Guerineau, F, Woolston, S, Brooks, L, Mullineaux, P  
45 (1988) An expression cassette for targeting foreign proteins into the chloroplasts. Nucl. Acids Res. 16: 11380).

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen Nukleinsäure-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen Genabschnitten 5 verschiedener Organismen bestehen.

Bevorzugt sind, wie vorstehend beschrieben, synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der 10 höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden.

Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu 15 erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

20 Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktions- 25 stellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet vorzugsweise in der 30 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine kodierende Nukleinsäuresequenz oder ein Nukleinsäurekonstrukt und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

35 Beispiele für einen Terminator sind der 35S-Terminator (Guerineau et al. (1988) Nucl Acids Res. 16: 11380), der nos Terminator (Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. J Mol Appl Genet. 1982;1(6):561-73) oder der ocs Terminator (Gielen, J, de 40 Beuckeleer, M, Seurinck, J, Debroek, H, de Greve, H, Lemmers, M, van Montagu, M, Schell, J (1984) The complete sequence of the TL-DNA of the Agrobacterium tumefaciens plasmid pTiAch5. EMBO J. 3: 835-846).

45 Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen,

## 110

Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primer-repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden.

- 5 Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.
- 10 Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff)
- 15 oder funktionelle Äquivalente.

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet.

- 20 Dazu können an sich bekannte Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt werden.

- Geeignete Methoden zur Transformation von Pflanzen sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone – die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der, vorstehend beschriebene, durch *Agrobacterium*
- 25 vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-143 sowie in Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42
- 30 (1991), 205-225) beschrieben.

- Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res.
- 40 12 (1984), 8711) oder besonders bevorzugt pSUN2, pSUN3, pSUN4 oder pSUN5 (WO 02/00900).

- Mit einem Expressionsplasmid transformierte Agrobakterien können in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer
- 45

## 111

Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Zur bevorzugten Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, im folgenden auch transgene Pflanzen bezeichnet, wird die fusionierte Expressionskassette, die eine Ketolase exprimiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19 oder insbesondere pSUN2 kloniert, der geeignet ist, in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert zu werden. Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

15

Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die Expressionskassette integriertes Gen für die Expression einer Nukleinsäure kodierend eine Ketolase enthalten.

25

Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine Ketolase kodierenden Nukleinsäure wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71-119 (1993) beschrieben.

35 Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pJIT117 (Guerineau et al. (1988) Nucl. Acids Res. 16 :11380),  
40 pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression konstitutiv  
45 oder vorzugsweise spezifisch in den Blütenblättern erfolgen.

## 112

Dementsprechend betrifft die Erfindung ferner ein Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, das man ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen blütenspezifischen Promotor und Nukleinsäuren kodierend eine Ketolase in das Genom der Ausgangspflanze einführt.

Die Erfindung betrifft ferner die genetisch veränderten Pflanzen, wobei die genetische Veränderung die Aktivität einer Ketolase in Blütenblättern,

- A für den Fall, das die Wildtyppflanze bereits eine Ketolase-Aktivität in Blütenblättern aufweist, gegenüber dem Wildtyp erhöht und
- 15 B für den Fall, das die Wildtyppflanze keine Ketolase-Aktivität in Blütenblättern aufweist, gegenüber dem Wildtyp verursacht.

Wie vorstehend ausgeführt erfolgt die Erhöhung oder Verursachung der Ketolase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp vorzugsweise durch eine Erhöhung oder Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Ketolase.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt, wie vorstehend ausgeführt, die Erhöhung oder Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Ketolase durch Einbringen von Nukleinsäuren kodierend eine Ketolase in die Pflanzen und damit vorzugsweise durch Überexpression oder transgene Expression von Nukleinsäuren kodierend eine Ketolase.

30 Bevorzugte transgene Pflanzen, die als Wildtyp keine Ketolaseaktivität in den Blütenblättern aufweisen, enthalten, wie vorstehend erwähnt, mindestens ein transgene Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase.

35 Besonders bevorzugte, genetisch veränderte Pflanzen weisen, wie vorstehend erwähnt, zusätzlich eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und/oder  $\beta$ -Cyclase-Aktivität gegenüber einer Wildtyppflanze auf. Weiter bevorzugte Ausführungsformen sind vorstehend im

40 erfindungsgemäßen Verfahren beschrieben.

Weiter bevorzugte, genetisch veränderte Pflanzen weisen, wie vorstehend erwähnt, zusätzlich eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität gegenüber einer Wildtyppflanze auf. Weiter bevorzugte Ausführungsformen sind vorstehend im erfindungsgemäßen Verfahren beschrieben.

## 113

Weiter besonders bevorzugte, genetisch veränderte Pflanzen weisen, wie vorstehend erwähnt, zusätzlich gegenüber dem Wildtyp mindestens eine weitere erhöhte Aktivität, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-  
5 2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität,  
10 tät, Phytoen-Synthase-Aktivität, Phytoen-Desaturase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität auf. Weiter bevorzugte Ausführungsformen sind vorstehend im erfindungsgemäßen Verfahren beschrieben.

15 Weiter besonders bevorzugte, genetisch veränderte Pflanzen weisen, wie vorstehend erwähnt, zusätzlich gegenüber dem Wildtyp eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase Aktivität auf. Weiter bevorzugte Ausführungsformen sind vorstehend im erfindungsgemäßen Verfahren beschrieben.

20

Unter Pflanzen werden erfindungsgemäß vorzugsweise Pflanzen verstanden, die als Wildtyp in Blütenblättern Chromoplasten aufweisen. Weiter bevorzugte Pflanzen weisen als Wildtyp in den Blütenblättern zusätzlich Carotinoide, insbesondere  $\beta$ -Carotin, Zea-  
25 xanthin, Violaxanthin oder Lutein auf. Weiter bevorzugte Pflanzen weisen als Wildtyp in den Blütenblättern zusätzlich eine  $\beta$ -Cyclase-Aktivität auf. Weiter bevorzugte Pflanzen weisen als Wildtyp in den Blütenblättern zusätzlich eine Hydroxylase-Aktivität auf.

30

Besonders bevorzugte Pflanzen sind Pflanzen ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae,  
35 Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Illiaceae oder Lamiaceae.

Die Erfindung betrifft daher insbesondere genetisch veränderte  
40 Pflanzen ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Astera-  
45 ceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae,



## 114

Illiciaceae, oder Lamiaceae enthaltend mindestens eine transgene Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase.

Ganz besonders bevorzugte genetisch veränderte Pflanzen sind aus-  
5 gewählt aus den Pflanzengattungen Marigold, Tagetes erecta, Tagetes patula, Adonis, Lycopersicon, Rosa, Calendula, Physalis, Medicago, Helianthus, Chrysanthemum, Aster, Tulipa, Narcissus, Petunia, Geranium oder Tropaeolum, wobei die genetisch veränderte Pflanze mindestens eine transgene Nukleinsäure, kodierend eine  
10 Ketolase, enthält.

Wie vorstehend erwähnt wird in bevorzugten transgenen Pflanzen die Ketolase in Blütenblättern exprimiert, besonderes bevorzugt ist die Expression der Ketolase in Blütenblättern am höchsten.

15

Die transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile, insbesondere deren Blütenblätter sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

20 Die genetisch veränderten Pflanzen können, wie vorstehend beschrieben, zur Herstellung von Ketocarotinoiden, insbesondere Astaxanthin verwendet werden.

Von Menschen und Tieren verzehrbare erfindungsgemäße, genetisch  
25 veränderte Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Ketocarotinoiden können auch beispielsweise direkt oder nach an sich bekannter Prozessierung als Nahrungsmittel oder Futtermittel oder als Futter- und Nahrungsergänzungsmittel verwendet werden. Ferner können die genetisch veränderten Pflanzen zur Herstellung von Ketocarotinoid-haltigen Extrakten der Pflanzen und/oder zur Herstellung von  
30 Futter- und Nahrungsergänzungsmitteln verwendet werden.

Die genetisch veränderten Pflanzen können auch als Zierpflanzen im Horticulture-Bereich verwendet werden.

35

Die genetisch veränderten Pflanzen weisen im Vergleich zum Wildtyp einen erhöhten Gehalt an Ketocarotinoiden auf.

Unter einem erhöhten Gehalt an Ketocarotinoiden wird in der Regel  
40 ein erhöhter Gehalt an Gesamt-Ketocarotinoid verstanden.

Unter einem erhöhten Gehalt an Ketocarotinoiden wird aber auch insbesondere ein veränderter Gehalt der bevorzugten Ketocarotinoide verstanden, ohne dass zwangsläufig der Gesamt-  
45 Carotinoidgehalt erhöht sein muss.

## 115

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform weisen die erfindungsgemäßen, genetisch veränderten Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp einen erhöhten Gehalt an Astaxanthin auf.

- 5 Unter einem erhöhten Gehalt wird in diesem Fall auch ein verursachter Gehalt an Ketocarotinoiden, bzw. Astaxanthin verstanden.

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

## 10

Allgemeine Experimentelle Bedingungen:  
Sequenzanalyse rekombinanter DNA

- Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem  
15 Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467).

Beispiel 1:

- 20 Amplifikation einer cDNA, die die gesamte Primärsequenz der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille kodiert

Die cDNA, die für die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* kodiert, wurde mittels PCR aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm

- 25 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen") Suspensionskultur amplifiziert.

Für die Präparation von Total-RNA aus einer Suspensionskultur von *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80), die 2 Wochen mit indirek-

- 30 tem Tageslicht bei Raumtemperatur in *Haematococcus*-Medium (1.2 g/l Natriumacetat, 2 g/l Hefeextrakt, 0.2 g/l  $MgCl_2 \times 6H_2O$ , 0.02  $CaCl_2 \times 2H_2O$ ; pH 6.8; nach Autoklavieren Zugabe von 400 mg/l L-Asparagin, 10 mg/l  $FeSO_4 \times H_2O$ ) gewachsen war, wurden die Zellen geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert.  
35 verisiert. Anschließend wurden 100 mg der gefrorenen, pulverisierten Algenzellen in ein Reaktionsgefäß überführt und in 0.8 ml Trizol-Puffer (LifeTechnologies) aufgenommen. Die Suspension wurde mit 0.2 ml Chloroform extrahiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12 000 g wurde der wässrige Überstand abgenommen  
40 und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Ethanol extrahiert. Die RNA wurde mit einem Volumen Isopropanol gefällt, mit 75% Ethanol gewaschen und das Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser mit 1/1000 Volumen Diethylpyrocarbonat bei Raumtemperatur, anschließend autoklaviert) gelöst.  
45 Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

## 116

Für die cDNA-Synthese wurden 2.5 µg Gesamt-RNA für 10 min bei 60°C denaturiert, für 2 min auf Eis abgekühlt und mittels eines cDNA-Kits (Ready-to-go-you-prime-beads, Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben unter Verwendung eines antisense spezifischen  
 5 Primers (PR1 SEQ ID NO: 29) in cDNA umgeschrieben.

Die Nukleinsäure kodierend eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Haematococcus pluvialis* unter Verwendung eines sense  
 10 spezifischen Primers (PR2 SEQ ID NO: 30) und eines antisense spezifischen Primers (PR1 SEQ ID NO: 29) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

15 Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 4 µl einer *Haematococcus pluvialis* cDNA (hergestellt wie oben  
 20 beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR1 (SEQ ID NO: 29)
- 0.2 mM PR2 (SEQ ID NO: 30)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 25 - 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

30	1X	94°C	2 Minuten
	35X	94°C	1 Minute
		53°C	2 Minuten
		72°C	3 Minuten
	1X	72°C	10 Minuten

35

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 29 und SEQ ID NO: 30 resultierte in einem 1155 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert (SEQ ID NO: 22). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-  
 40 Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert und der Klon pGKETO2 erhalten.

Sequenzierung des Klons pGKETO2 mit dem T7- und dem SP6-Primer bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in den drei Codons  
 45 73, 114 und 119 in je einer Base von der publizierten Sequenz X86782 unterscheidet. Diese Nukleotidaustausche wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsen-

## 117

tieren somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Haematococcus pluvialis* Stamm 192.80 (Abbildung 3 und 4, Sequenzvergleiche).

Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1027 Bp SpHI-Fragmentes aus pGEM-Teasy und Ligierung in den SpHI geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der die *Haematococcus pluvialis* Ketolase in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcs Transitpeptid enthält, heißt pJKETO2.

## Beispiel 2:

Amplifikation einer cDNA, die die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-terminus kodiert

Die cDNA, die für die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus kodiert, wurde mittels PCR aus *Haematococcus pluvialis* Suspensionskultur (Stamm 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen") amplifiziert.

Die Präparation von Total-RNA aus einer Suspensionskultur von *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) erfolgte wie in Beispiel 1 beschrieben.

Die cDNA-Synthese erfolgte wie unter Beispiel 1 beschrieben.

Die Nukleinsäure kodierend eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Haematococcus pluvialis* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR3 SEQ ID NO: 31) und eines antisense spezifischen Primers (PR1 SEQ ID NO: 29) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein mit um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus kodiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 4 µl einer *Haematococcus pluvialis* cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 45 - 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR1 (SEQ ID NO: 29)
- 0.2 mM PR3 (SEQ ID NO: 31)

## 118

- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 µl Aq. Dest.

5 Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

	1X	94°C	2 Minuten
	35X	94°C	1 Minute
		53°C	2 Minuten
10		72°C	3 Minuten
	1X	72°C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 29 und SEQ ID NO: 31 resultierte in einem 1111 Bp Fragment, das für ein Ketolase Protein  
 15 kodiert, bei dem N-terminalen Aminosäuren (Position 2-16) durch eine einzige Aminosäure (Leucin) ersetzt sind.

Das Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert. Sequenzie-  
 20 rungen mit den Primern T7- und SP6 bestätigten eine zur Sequenz SEQ ID NO: 22 identische Sequenz, wobei die 5'-Region (Position 1-53) der SEQ ID NO: 22 im Amplifikat SEQ ID NO: 24 durch eine in der Sequenz abweichende Nonamersequenz ersetzt wurde. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvek-  
 25 tor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 985 Bp SpHI Fragmentes aus pGEM-Teasy und Ligierung mit dem SpHI geschnittenen Vek-  
 30 tor pJIT117. Der Klon, der die *Haematococcus pluvialis* Ketolase mit einem um 14 Aminosäuren verkürzten N-Terminus in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJKETO3.

### 35 Beispiel 3:

Amplifikation einer cDNA, die die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille (Stamm 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen") bestehend aus der gesamten Primärsequenz und fusioniertem C-terminalem myc-Tag kodiert.

40

Die cDNA, die für die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) bestehend aus der gesamten Primärsequenz und fusioniertem C-terminalem myc-Tag kodiert, wurde mittels PCR unter Verwendung des Plasmids pGKETO2 (in Beispiel 1 beschrieben) und des Primers  
 45 PR15 (SEQ ID NO: 32) hergestellt. Der Primer PR15 setzt sich zusammen aus einer antisense spezifischen 3'-Region (Nucleotide

## 119

40 bis 59) und einer myc-Tag kodierenden 5'-Region (Nucleotide 1 bis 39).

Die Denaturierung (5 min bei 95°C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40°C) von pGKETO2 und PR15 erfolgte in einem 11.5 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µg pGKETO2 PlasmidDNA
- 0.1 µg PR15 (SEQ ID NO: 32)

10

Das Auffüllen der 3'-Enden (30 min bei 30°C) erfolgte in einem 20 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 11.5 µl pGKETO2/PR15-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 µM dNTPs
- 2 µl 1X Klenow Puffer
- 2U Klenow Enzym

15

20 Die Nukleinsäure kodierend eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) bestehend aus der gesamten Primärsequenz und fusioniertem C-terminalem myc-Tag wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Haematococcus pluvialis* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR2 SEQ ID NO: 30) und eines antisense spezifischen Primers (PR15 SEQ ID NO: 32) amplifiziert.

25

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein mit fusioniertem C-terminalem myc-Tag kodiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl einer Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 35 - 0.2 mM PR15 (SEQ ID NO: 32)
- 0.2 mM PR2 (SEQ ID NO: 30)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 µl Aq. Dest.

40

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
45	53°C	1 Minute
	72°C	1 Minute
1X	72°C	10 Minuten

## 120

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO:32 und SEQ ID NO:30 resultierte in einem 1032 Bp-Fragment, das für ein Protein kodiert, bestehend aus der gesamten Primärsequenz der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* als zweifache translationale Fusion mit dem  
5 rbcS Transitpeptide am N-Terminus und dem myc-Tag am C-Terminus.

Das Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7- und SP6 bestätigten eine zur Sequenz SEQ ID NO: 22 identische Sequenz, wobei die 3'Region (Position 993 bis 1155) der SEQ ID NO: 22 im Amplifikat SEQ ID NO: 26 durch eine in der abweichende Sequenz aus 39 Bp ersetzt wurde. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380)  
15 verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1038 Bp EcoRI-SpHI Fragmentes aus pGEM-Teasy und Ligierung mit dem EcoRI-SpHI geschnittenen Vektor pJIT117. Durch die Ligation entsteht eine  
20 translationale Fusion zwischen dem C-Terminus der rbcS Transitpeptidsequenz und dem N-Terminus der Ketolase Sequenz. Der Klon, der die *Haematococcus pluvialis* Ketolase mit fusioniertem C-terminalen myc-Tag in der korrekten Orientierung als translationale N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst  
25 pJKETO4.

## Beispiel 4:

Herstellung von Expressionsvektoren zur konstitutiven Expression der *Haematococcus pluvialis* Ketolase in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.

30

Die Expression der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *L. esculentum* und in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle des konstitutiven Promoters d35S aus CaMV (Franck et al. 1980, Cell 21: 285-294). Die Expression erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS  
35 aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715).

Die Herstellung einer Expressionskassette für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären  
40 Vektors pSUN3 (WO02/00900).

- Zur Herstellung des Expressionsvektors pS3KETO2 wurde das 2.8 Kb SacI-XhoI Fragment aus pJKETO2 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 5A, Konstruktkarte). In der Abbildung 5A beinhaltet Fragment d35S den duplizierten 35S Promoter (747 bp), Fragment rbcS das rbcS Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment KETO2 (1027 bp) die gesamte  
45

## 121

Primärsequenz kodierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase, Fragment *term* (761 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

- 5 - Zur Herstellung des Expressionsvektors pS3KETO3 wurde das 2.7 Kb bp *SacI*-*XhoI* Fragment aus pJKETO3 mit dem *SacI*-*XhoI* geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert. (Abbildung 6, Konstruktkarte). In der Abbildung 6 beinhaltet Fragment *d35S* den duplizierten 35S Promoter (747 bp), Fragment *rbcS* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment *KETO3* (985 bp) die um 14 N-terminale Aminosäuren verkürzte Primärsequenz kodierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase, Fragment *term* (761 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.
- 10
- 15 - Zur Herstellung des Expressionsvektors pS3KETO4 wurde das 2.8 Kb *SacI*-*XhoI* Fragment aus pJKETO4 mit dem *SacI*-*XhoI* geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert. (Abbildung 7, Konstruktkarte). In der Abbildung 7 beinhaltet Fragment *d35S* den duplizierten 35S Promoter ((747 bp), Fragment *rbcS* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment *KETO4* (1038 bp) die gesamte Primärsequenz kodierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase mit C-terminalem myc-Tag, Fragment *term* (761 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.
- 20
- 25 Die Herstellung einer Expressionskassette für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).
- 30 - Zur Herstellung des *Tagetes*-Expressionsvektors pS5KETO2 wurde das 2.8 Kb *SacI*-*XhoI* Fragment aus pJKETO2 mit dem *SacI*-*XhoI* geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 5B, Konstruktkarte). In der Abbildung 5B beinhaltet Fragment *d35S* den duplizierten 35S Promoter (747 bp), Fragment *rbcS* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment *KETO2* (1027 bp) die gesamte Primärsequenz kodierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase, Fragment *term* (761 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.
- 35
- 40 Beispiel 5A:  
Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der *Haematococcus pluvialis* Ketolase in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.
- 45 Die Expression der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *L. esculentum* und *Tagetes erecta* erfolgte mit dem Transitpeptid *rbcS* aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715). Die



## 122

Expression erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion 9298 bis 10200; Hill et al. (1998) Development 125: 1711-1721).

5

Das DNA Fragment, das die AP3 Promoterregion -902 bis +15 aus *Arabidopsis thaliana* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethoden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) sowie der Primer PR7 (SEQ ID NO: 33) und PR10  
10 (SEQ ID NO: 36) hergestellt.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment  
15 (-902 bis +15) beinhaltet, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 100 ng genomischer DNA aus *A.thaliana*
- 0.25 mM dNTPs
- 20 - 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 33)
- 0.2 mM PR10 (SEQ ID NO: 36)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.
- 25 Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	50°C	1 Minute
30	72°C	1 Minute
1X	72°C	10 Minuten

Das 922 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und  
35 das Plasmid pTAP3 erhalten.

Sequenzierung des Klons pTAP3 bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion (ein G in Position 9765 der Sequenz AL132971) und einen Basenaustausch (ein G statt ein A  
40 in Position 9726 der Sequenz AL132971) von der publizierten AP3 Sequenz (AL132971, Nukleotidregion 9298 bis 10200) unterscheidet. Diese Nukleotidunterschiede wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die tatsächliche Nukleotidsequenz in den verwendeten *Arabidopsis*  
45 *thaliana* Pflanzen.

## 123

Die modifizierte Version AP3P wurde mittels rekombinanter PCR unter Verwendung des Plasmids pTAP3 hergestellt. Die Region 10200 bis 9771 wurde mit den Primern PR7 (SEQ ID NO: 33) und Primern PR9 (SEQ ID NO: 35) amplifiziert (Amplifikat A7/9), die Region 5 9526 bis 9285 wurde mit den PR8 (SEQ ID NO: 34) und PR10 (SEQ ID NO: 36) amplifiziert (Amplifikat A8/10).

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

10 Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die die Regionen Region 10200-9771 und Region 9526 bis 9285 des AP3 Promoters beinhalten, erfolgte in 50  $\mu$ l Reaktionsansätzen, in denen enthalten war:

- 15 - 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)  
 - 0.25 mM dNTPs  
 - 0.2 mM sense Primer (PR7 SEQ ID NO: 33 bzw. PR8 SEQ ID NO: 34)  
 - 0.2 mM antisense Primer (PR9 SEQ ID NO: 35 bzw. PR10 SEQ ID NO: 36)  
 20 - 5  $\mu$ l 10X PCR-Puffer (Stratagene)  
 - 0.25  $\mu$ l Pfu Taq Polymerase (Stratagene)  
 - 28.8  $\mu$ l Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 25  
 1X            94°C            2 Minuten  
 35X            94°C            1 Minute  
               50°C            1 Minute  
               72°C            1 Minute  
 30 1X            72°C            10 Minuten

Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A7/9 und A8/10, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende 35 Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte Version des AP3 Promoters, AP3P, in dem die Positionen 9670 bis 9526 deletiert sind. Die Denaturierung (5 min bei 95°C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40°C) beider Amplifikate A7/9 und A8/10 erfolgte in einem 17.6  $\mu$ l Reaktionsansatz, in 40 dem enthalten war:

- 0.5  $\mu$ g A7/9 Amplifikat  
 - 0.25  $\mu$ g A8/10 Amplifikat

## 124

Das Auffüllen der 3'Enden (30 min bei 30°C) erfolgte in einem 20 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 5 - 17.6 µg A7/9 und A8/10-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 µM dNTPs
- 2 µl 1X Klenow Puffer
- 2U Klenow Enzym

10 Die Nukleinsäure kodierend für die modifizierte Promoterversion AP3P wurde mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR7 SEQ ID NO: 33) und eines antisense spezifischen Primers (PR10 SEQ ID NO: 36) amplifiziert.

15 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des AP3P Fragmentes erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 20 - 1 µl Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
  - 0.25 mM dNTPs
  - 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 33)
  - 0.2 mM PR10 (SEQ ID NO: 36)
  - 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 25 - 0.25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

30	1X	94°C	2 Minuten
	35X	94°C	1 Minute
		50°C	1 Minute
		72°C	1 Minute
	1X	72°C	10 Minuten

35

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 33 und SEQ ID NO: 36 resultierte in einem 778 Bp Fragment das für die modifizierte Promoterversion AP3P kodiert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den

- 40 Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz AL132971, Region 10200 bis 9298 identische Sequenz, wobei die interne Region 9285 bis 9526 deletiert wurde. Diese Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

45

## 125

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pTAP3P und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter AP3P anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJAP3P.

5

Zur Herstellung einer Expressionskassette pJAP3PKETO2 wurde das 1027 Bp SpHI-Fragment KETO2 (in Beispiel 1 beschrieben) in den SpHI geschnittenen Vektor pJAP3P kloniert. Der Klon, der das Fragment KETO2 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJAP3PKETO2.

10

Zur Herstellung einer Expressionskassette pJAP3PKETO4 wurde das 1032 Bp SpHI-EcoRI Fragment KETO4 (in Beispiel 3 beschrieben) in den SpHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAP3P kloniert. Der Klon, der das Fragment KETO4 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJAP3PKETO4.

15

Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P-kontrollierten Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO02/00900).

20

- Zur Herstellung des Expressionsvektors pS3AP3PKETO2 wurde das 2.8 KB bp SacI-XhoI Fragment aus pJAP3PKETO2 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 8A, Konstruktkarte). In der Abbildung 8A beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment *rbcS* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment KETO2 (1027 bp) die gesamte Primärsequenz kodierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase, Fragment *term* (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

25

30

- Zur Herstellung des Expressionsvektors pS3AP3PKETO4 wurde das 2.8 KB SacI-XhoI Fragment aus pJAP3PKETO4 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert. (Abbildung 9, Konstruktkarte). In der Abbildung 9 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment *rbcS* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment KETO4 (1038 bp) die gesamte Primärsequenz kodierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase mit C-terminalem myc-Tag, Fragment *term* (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

35

40

## 126

Die Herstellung einer Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P-kontrollierten Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

5

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AP3PKETO2 wurde das 2.8 KB bp SacI-XhoI Fragment aus pJAP3PKETO2 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 8B, Konstruktkarte). In der Abbildung 8B beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment *rbcS* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment *KETO2* (1027 bp) die gesamte Primärsequenz kodierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase, Fragment *term* (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV

15

Beispiel 5B:

Amplifikation einer chimären cDNA, die die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille mit einer heterologen 5' nicht translatierten Region (5'UTR) beinhaltet, und Herstellung eines Expressionsvektors zur blütenspezifischen Expression der *Haematococcus pluvialis* Ketolase ohne Verwendung eines heterologen Transitpeptides in *Lycopersicon esculentum*.

Die cDNA, die die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) folgend auf eine heterologe "5'nicht-translatierten Region" (5'UTR) enthält, wurde mittels PCR hergestellt.

Die Nukleinsäure kodierend eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) mit einer "5'nicht-translatierten Region" (5'UTR) wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus dem Plasmid pGKETO2 unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR142 SEQ ID NO: 78) und eines antisense spezifischen Primers (PR1 SEQ ID NO: 29) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

35

Die PCR zur Amplifikation des Fragmentes, das sowohl für ein Ketolase Protein kodiert als auch eine heterologe 5'UTR Region enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

40

- 10 ng des Plasmids pGKETO2 (in Beispiel 1 beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR1 (SEQ ID NO: 29)
- 0.2 mM PR142 (SEQ ID NO: 78)

45

- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 µl Aq. Dest.

## 127

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
5	53°C	2 Minuten
	72°C	3 Minuten
1X	72°C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit PR1 und PR142 resultierte in einem  
 10 1.1 KB Fragment, das eine heterologe 5'UTR Region, gefolgt von  
 der kodierenden Region für ein Ketolase, enthält (SEQ ID NO: 79)

Das Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den  
 PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierung-  
 15 gen des resultierenden Klonen pTA-KETO5 mit den Primern T7 und  
 M13 bestätigten eine Sequenz (SEQ ID NO: 79), die [abgesehen vom  
 5'Terminus, der identisch zu pJIT117 ist (Guerineau et al. 1988,  
 Nucl. Acids Res. 16: 11380)], identisch zur Sequenz SEQ ID NO: 22  
 ist. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expres-  
 20 sionsvektor pJAP3PKETO2 (Beispiel 5A) verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 0.3 KB HindIII Frag-  
 mentes aus pTA-KETO5 und Ligierung in den HindIII-geschnittenen  
 Vektor pJAP3PKETO2. Der Klon, der den AP3P Promoter, gefolgt vom  
 25 5'UTR aus pJIT117 und der kompletten kodierenden Sequenz für die  
*Haematococcus pluvialis* Ketolase enthält, heisst pJAP3PKETO5.

Die Expression der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *L.*  
*esculentum* erfolgte unter Kontrolle des Promoters AP3P (siehe  
 30 Beispiel 5A ) und des 5'UTRs aus pJIT117. Die Herstellung einer  
 Expressionskassette für die Agrobacterium-vermittelte Trans-  
 formation der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *L. esculen-*  
*tum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3  
 (WO 02/00900).

35

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS3AP3PKETO5 wurde das 2.8  
 Kb SacI-XhoI Fragment aus pJAP3PKETO5 mit dem SacI-XhoI geschnit-  
 tenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 21, Konstruktkarte). In der  
 Abbildung 21 beinhaltet Fragment AP3P den AP3P-Promoter (747 bp),  
 40 Fragment 5'UTR die 5'UTR Sequenz aus pJIT117 (30 bp), Fragment  
 KETO5 (1.0 kb) die gesamte Primärsequenz kodierend für die *Haema-*  
*tococcus pluvialis* Ketolase, Fragment term (761 bp) das Polyade-  
 nylierungssignal von CaMV.

## Beispiel 6:

Herstellung und Analyse transgener *Lycopersicon esculentum*  
Pflanzen

- 5 Transformation und Regeneration von Tomatenpflanzen erfolgte nach der publizierten Methode von Ling und Mitarbeitern (Plant Cell Reports (1998), 17:843-847). Für die Varietät Microtom wurde mit höherer Kanamycin-Konzentration (100mg/L) selektioniert.
- 10 Als Ausgangsexplantat für die Transformation dienten Kotyledonen und Hypokotyle sieben bis zehn Tage alter Keimlinge der Linie Microtom. Für die Keimung wurde das Kulturmedium nach Murashige und Skoog (1962: Murashige and Skoog, 1962, Physiol. Plant 15, 473-) mit 2 % Saccharose, pH 6.1 verwendet. Die Keimung fand bei 21°C
- 15 bei wenig Licht (20 bis 100 µE) statt. Nach sieben bis zehn Tagen wurden die Kotyledonen quer geteilt und die Hypokotyle in ca. 5 bis 10 mm lange Abschnitte geschnitten und auf das Medium MSBN (MS, pH 6,1, 3% Saccharose + 1 mg/l BAP, 0,1 mg/l NAA) gelegt, das am Vortag mit suspensionskultivierten Tomatenzellen beschickt
- 20 wurde. Die Tomatenzellen wurden luftblasenfrei mit sterilem Filterpapier abgedeckt. Die Vorkultur der Explantate auf dem beschriebenen Medium erfolgte für drei bis fünf Tage. Zellen des Stammes Agrobakterium tumefaciens LBA4404 wurden einzeln mit den Plasmiden pS3KETO2, pS3KETO3, pS3AP3PKETO5 bzw. pS3AP3KETO2
- 25 transformiert. Von den einzelnen mit den Binärvektoren pS3KETO2, pS3KETO3 bzw. pS3KETO2 transformierten Agrobakterium-Stämmen wurde jeweils eine Übernachtskultur in YEB Medium mit Kanamycin (20 mg/l) bei 28 Grad Celsius kultiviert und die Zellen zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde mit flüssigem MS Medium (3 %
- 30 Saccharose, pH 6,1) resuspendiert und auf eine optische Dichte von 0,3 (bei 600 nm) eingestellt. Die vorkultivierten Explantate wurden in die Suspension überführt und für 30 Minuten bei Zimmertemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Explantate mit sterilem Filterpapier getrocknet und
- 35 für die dreitägige Co-Kultur (21°C) auf ihr Vorkulturmedium zurück gelegt.

- Nach der Co-kultur wurden die Explantate auf MSZ2 Medium (MS pH 6,1 + 3 % Saccharose, 2 mg/l Zeatin, 100 mg/l Kanamycin,
- 40 160 mg/l Timentin) transferiert und für die selektive Regeneration bei 21°C unter Schwachlicht Bedingungen (20 bis 100 µE, Lichtrythmus 16 h/8 h) aufbewahrt. Alle zwei bis drei Wochen erfolgte der Transfer der Explantate bis sich Sprosse bilden. Kleine Sprosse konnten vom Explantat abgetrennt werden und auf MS
- 45 (pH 6,1 + 3 % Saccharose) 160 mg/l Timentin, 30 mg/l Kanamycin,

## 129

0,1 mg/l IAA bewurzelt werden. Bewurzelte Pflanzen wurden ins Gewächshaus überführt.

Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden mit 5 folgenden Expressionskonstrukten folgende Linien erhalten:

Mit pS3KETO2 wurde erhalten: cs13-8, cs13-24, cs13-30, cs13-40.

Mit pS3KETO3 wurde erhalten: cs14-2, cs14-3, cs14-9, cs14-19.

10

Mit pS3AP3PKETO2 wurde erhalten: cs16-15, cs16-34, cs16-35, cs16-40.

Tabelle 1a zeigt das Erscheinungsbild der Blütenblätter der 15 erfindungsgemäß genetisch veränderten Tomatenpflanzen. Die Analyse der Ketocarotinoide erfolgte wie nachstehend beschrieben.

Tabelle 1a

20	Pflanze	Blütenfarbe	Astaxanthin	Adonixanthin
	Control	gelb	nein	nein
	Control	gelb	nein	nein
	CS13-8	orange	ja	ja
	CS13-24	orange	ja	ja
25	CS13-30	orange	ja	ja
	CS13-40	orange	ja	ja
	CS14-2	orange	ja	ja
	CS14-3	orange	ja	ja
	CS14-9	orange	ja	ja
	CS14-19	orange	ja	ja
30	CS16-15	orange	ja	ja
	CS 16-34	orange	ja	ja
	CS 16-35	orange	ja	ja
	CS 16-40	orange	ja	ja

35 Die Quantifizierung der Carotinoide erfolgte durch Extraktion der Pigmente in Aceton, enzymatische Hydrolyse der Carotinoidester und Auftrennung der freigesetzten Carotinoide mittels HPLC. Experimentelle Details sowie Laufbedingungen der HPLC-Trennungen sind in Beispiel 9 detailliert beschrieben.

40

45



## 130

Tabelle 1b zeigt das Carotinoidprofil in Petalen der gemäß der vorstehend beschriebenen Beispiele hergestellten transgenen Tomatenpflanzen einschließlich Kontrollen. Carotinoidkonzentrationen sind Mittelwerte verschiedener Linien und prozentual

5 bezogen auf den Gehalt an Gesamtcarotinoiden.

Tabelle 1b

	Tomato	Viola- xan- thin	Anthera- xanthin	Lutein	Zea- xan- thin	Crypto- xanthin	Beta/ zeta- carotene	Asta- xan- thin	Adoni- xanthin	Adon irubin	3'-Hydroxy- echinenone
10	control	70,6	14	13,2	1	0,2	0,95				
	CS16 plant		0,5	1	3,2	0,3	15,3	61	4,1	15,2	
	Cs 13 plant			9,7	0,4	0,05	9	68	1,3	12,3	0,2
15											

Beispiel 7:

Herstellung transgener Tagetes Pflanzen

- 20 Tagetessamen werden sterilisiert und auf Keimungsmedium (MS-Medium; Murashige and Skoog, *Physiol. Plant.* 15(1962), 473-497) pH 5,8, 2 % Saccharose) aufgelegt. Die Keimung erfolgt in einem Temperatur/Licht/Zeitintervall von 18 bis 28°C/20-200 µE/3 bis 16 Wochen, bevorzugt jedoch bei 21°C, 20 bis 70 µE, für 4 bis
- 25 8 Wochen.

- Alle Blätter der sich bis dahin entwickelten in vitro Pflanzen werden geerntet und quer zur Mittelrippe geschnitten. Die dadurch entstehenden Blattexplantate mit einer Größe von 10 bis 60 mm<sup>2</sup>
- 30 werden im Verlaufe der Präparation in flüssigem MS-Medium bei Raumtemperatur für maximal 2 h aufbewahrt.

- Ein beliebiger Agrobakterium tumefaciens Stamm, bevorzugt aber ein supervirulenter Stamm, wie z.B. EHA105 mit einem entsprechenden Binärplasmid, das ein Selektionsmarkergen (bevorzugt bar oder pat) sowie ein oder mehrere Trait- oder Reportergene tragen kann wird (beispielsweise pS5KETO2 und pS5AP3PKETO2), über Nacht
- 35 angezogen und für die Co-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet. Die Anzucht des Bakterienstammes kann wie folgt erfolgen: Eine Einzelkolonie des entsprechenden Stammes wird in YEB (0,1 % Hefeextrakt, 0,5 % Rindfleischextrakt, 0,5 % Pepton, 0,5 % Saccharose, 0,5 % Magnesiumsulfat x 7 H<sub>2</sub>O) mit 25 mg/l Kanamycin angeimpft und bei 28°C für 16 bis 20 h angezogen. Anschließend
- 40 wird die Bakteriensuspension durch Zentrifugation bei 6000 g für
- 45 10 min geerntet und derart in flüssigem MS Medium resuspendiert,

## 131

dass eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,1 bis 0,8 entstand. Diese Suspension wird für die C-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet.

Unmittelbar vor der Co-Kultivierung wird das MS-Medium, in dem  
5 die Blätter aufbewahrt worden sind, durch die Bakteriensuspension ersetzt. Die Inkubation der Blättchen in der Agrobakteriensuspension erfolgte für 30 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Anschließend werden die infizierten Explantate auf ein mit Agar (z.B. 0,8 % Plant Agar (Duchefa, NL) verfestigtes MS-Medium  
10 mit Wachstumsregulatoren, wie beispielsweise 3 mg/l Benzylaminopurin (BAP) sowie 1 mg/l Indolyllessigsäure (IAA) aufgelegt. Die Orientierung der Blätter auf dem Medium ist bedeutungslos. Die Kultivierung der Explantate findet für 1 bis 8 Tage, bevorzugt aber für 6 Tage statt, dabei können folgende Bedingungen angewendet werden: Lichtintensität: 30 bis 80 µMol/m<sup>2</sup> x sec, Temperatur:  
15 22 bis 24°C, hell/dunkel Wechsel von 16/8 Stunden. Anschließend werden die co-kultivierten Explantate auf frisches MS-Medium, bevorzugt mit den gleichen Wachstumsregulatoren übertragen, wobei dieses zweite Medium zusätzlich ein Antibiotikum zur Unterdrückung des Bakterienwachstums enthält. Timentin in einer Konzentration von 200 bis 500 mg/l ist für diesen Zweck sehr geeignet. Als zweite selektive Komponente wird eine für die Selektion des Transformationserfolges eingesetzt. Phosphinothricin in einer Konzentration von 1 bis 5 mg/l selektiert sehr effizient, aber  
25 auch andere selektive Komponenten gemäß des zu verwendenden Verfahrens sind denkbar.

Nach jeweils ein bis drei Wochen erfolgt der Transfer der Explantate auf frisches Medium bis sich Sprossknospen und kleine  
30 Sprosse entwickeln, die dann auf das gleiche Basalmedium einschließlich Timentin und PPT oder alternative Komponenten mit Wachstumsregulatoren, nämlich z.B. 0,5 mg/l Indolylbuttersäure (IBA) und 0,5 mg/l Gibberillinsäure GA<sub>3</sub>, zur Bewurzelung übertragen werden. Bewurzelte Sprosse können ins Gewächshaus überführt werden.  
35

Zusätzlich zu der beschriebenen Methode sind folgende vorteilhafte Modifikationen möglich:

- 40 • Bevor die Explantate mit den Bakterien infiziert werden, können sie für 1 bis 12 Tage, bevorzugt 3 bis 4, auf das oben beschriebene Medium für die Co-Kultur vorinkubiert werden. Anschließend erfolgt die Infektion, Co-Kultur und selektive Regeneration wie oben beschrieben.

## 132

- Der pH Wert für die Regeneration (normalerweise 5,8) kann auf pH 5,2 gesenkt werden. Dadurch wird die Kontrolle des Agrobakterienwachstums verbessert.
- 5 • Die Zugabe von AgNO<sub>3</sub> (3 bis 10 mg/l) zum Regenerationsmedium verbessert den Zustand der Kultur einschließlich der Regeneration selbst.
- Komponenten, die die Phenolbildung reduzieren und dem Fachmann bekannt sind, wie z.B. Zitronensäure, Ascorbinsäure, PVP u.v.a.m., wirken sich positiv auf die Kultur aus.
- 10 • Für das gesamte Verfahren kann auch flüssiges Kulturmedium Verwendung finden. Die Kultur kann auch auf handelsüblichen Trägern, die auf dem flüssigen Medium positioniert werden inkubiert werden.
- 15

Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden mit folgenden Expressionskonstrukten folgende Linien erhalten:

20

Mit pS5KETO2 wurde beispielsweise erhalten: cs18-1 und cs18-2, mit pS5AP3PKETO2 wurde beispielsweise erhalten: cs19-1, cs19-2 und cs19-3.

## 25 Beispiel 8

Charakterisierung der transgenen Pflanzenblüten

## Beispiel 8.1

Trennung von Carotinoidestern in Blütenblättern transgener Pflanzen

30 zen

Allgemeine Arbeitsvorschrift:

Die Blütenblätter der transgenen Pflanzen werden in flüssigem Stickstoff gemörsernt und das Petalenpulver (etwa 40 mg) mit 100 % Aceton extrahiert (dreimal je 500 µl). Das Lösungsmittel wird evaporiert und die Carotinoide in 100 bis 200 µl Petrolether/Aceton (5:1, v/v) resuspendiert.

40 Die Carotinoide werden in konzentrierter Form mittels Dünnschicht-Chromatographie (TLC) auf Silica60 F254- Platten (Merck) in einem organischen Laufmittel (Petrolether/Aceton; 5:1) entsprechend ihrer Phobizität aufgetrennt. Gelbe (Xanthophyllester), rote (Ketocarotinoidester) und orange Banden (Mischung aus Xanthophyll- und Ketocarotinoidestern) auf der TLC werden ausgekratzt.

## 133

Die an Silica gebundenen Carotinoide werden dreimal mit 500 µl Aceton eluiert, das Lösungsmittel evaporiert und die Carotinoide mittels HPLC aufgetrennt und identifiziert.

- 5 Mittels einer C30-reverse phase-Säule kann zwischen Mono- und Diestern der Carotinoide unterschieden werden. HPLC-Laufbedingungen waren nahezu identisch mit einer publizierten Methode (Frazer et al.(2000), Plant Journal 24(4): 551-558). Eine Identifizierung der Carotinoide ist aufgrund der UV-VIS-Spektren möglich.

10

Petalenmaterial der transgenen Tomatenpflanzen CS13-8, cs13-24, cs13-30, cs13-40, cs14-2, cs14-3, cs14-9, cs14-19 wurden gemörsert und mit Aceton extrahiert. Extrahierte Carotinoide wurden mittels TLC aufgetrennt. In beiden Linien konnten Mono- und

- 15 Diester von Ketocarotinoiden detektiert werden; die Monoester waren in deutlich geringerer Konzentration als die Diester vorhanden.

HPLC-Analysen ergaben, das Diester der Xanthophylle (gelbe Bande) und der Ketocarotinoide (rote Bande) vorlagen; die Diester der Ketocarotinoide lagen in etwa 10mal höherer Konzentration vor als die Monoester (Abbildung 10).

20

- Petalenmaterial der transgenen Tomatenpflanzen cs16-15, cs16-34, cs16-35, cs16-40, die den AP3-Promotor tragen, wurden gemörsert und mit Aceton extrahiert. Extrahierte Carotinoide wurden mittels TLC aufgetrennt. Monoester von Ketocarotinoiden konnten nicht oder nur in äußerst geringer Konzentration nachgewiesen werden. Diester der Ketocarotinoide waren in gleicher Menge wie in Linien CS13 und CS14 vorhanden. Diester der Xanthophylle waren mengenmäßig wenig verändert im Vergleich zu Kontrollpflanzen.

25

30

- Abbildung 9A zeigt ein Dünnschicht-Chromatogramm. Die Carotinoide aus Tomatenpetalen wurden mit Aceton extrahiert und mittels Dünnschicht-Chromatographie aufgetrennt. Im Vergleich zu Kontroll-Extrakten konnten zusätzliche Carotinoidbanden [(1), (2) und (3)] in Petalen transgener Tomatenpflanzen detektiert werden.

35

- Abbildung 10 zeigt ein HPLC-Diagramm. Die zusätzlichen Carotinoidbanden in Petalen transgener Tomatenfrüchte (siehe (1-3) in Abbildung 9A) wurden extrahiert, mit Aceton eluiert und mittels HPLC analysiert. (1) wurde als Monoester, (2) und (3) wurden als Diester identifiziert.

## Beispiel 9

## Enzymatische Hydrolyse von Carotinoidestern und Identifizierung der Carotinoide

## 5 Allgemeine Arbeitsvorschrift

Gemörsertes Petalenmaterial (50 bis 100 mg Frischgewicht) wird mit 100 % Aceton (dreimal 500 µl; jeweils etwa 15 Minuten schütteln) extrahiert. Das Lösungsmittel wird evaporiert. Carotinoide werden anschließend in 400 µl Aceton aufgenommen (Absorption bei 475 nm zwischen 0,75 und 1,25) und 5 min im Ultraschall-Bad behandelt. Der Carotinoid-Extrakt wird mit 300 µl 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,0) gemischt und 5 bis 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach erfolgt die Zugabe von 100 bis 200 µl Cholesterol-Esterase (Stammlösung: 6,8 units/ml einer Cholesterol-Esterase von *Pseudomonas spec.*). Nach 8 bis 12 Stunden wird nochmals 100 bis 200 µl Enzym zugegeben; Hydrolyse der Ester erfolgt innerhalb von 24 Stunden bei Inkubation bei 37°C. Nach Zugabe 0,35 g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>·10H<sub>2</sub>O und 500 µl Petrolether wird gut gemischt und zentrifugiert (3 Minuten; 4500 g). Petrolether-Phase wird abgezogen und nochmals mit 0,35 g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>·10H<sub>2</sub>O (anhydrous) gemischt. Zentrifugation für 1 Minute bei 10000 g. Petrolether wird evaporiert und freie Carotinoide werden in 100 bis 120 µl Aceton aufgenommen. Mittels HPLC und C30-reverse phase-Säule können freie Carotinoide aufgrund von Retentionszeit und UV-VIS-Spektren identifiziert werden.

Isolierte Ketocarotinoidester (Mono- und Diester) der Linien CS13, CS14 und CS16 wurden mit Cholesterol-Esterase hydrolysiert und die freigesetzten Carotinoide mittels HPLC aufgetrennt. Identifizierung der Carotinoide erfolgte aufgrund von Retentionszeit und Spektrum im Vergleich zu Carotinoid-Standards. Mono- und Diester enthalten Astaxanthin in hoher Konzentration (90%) und Adonixanthin in geringer Konzentration (10%). (siehe Tabelle und Abbildungen)

Abbildung 11 zeigt ein HPLC-Diagramm. Die eluierten Ester aus Beispiel 9 (Abbildung 10) wurden enzymatisch hydrolysiert und die Hydrolyseprodukte mittels HPLC analysiert. Sowohl Mono- als auch Diester enthalten Astaxanthin als Hauptcarotinoid sowie Adonixanthin in geringer Konzentration.

## 135

Beispiel 10:

Herstellung eines Klonierungsvektors zur Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die blütenspezifischen Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta*

5

Die Expression von Inverted-Repeat Transkripten bestehend aus Fragmenten der Epsilon-Cyclase in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion 10 9298 bis 10200; Hill et al. (1998) Development 125: 1711 bis 1721).

Das Inverted-Repeat Transkript enthält jeweils ein Fragment in korrekter Orientierung (Sense-Fragment) und ein sequenzidentisches Fragment in entgegengesetzter Orientierung (Antisense-Fragment), die durch ein funktionelles Intron, das PIV2 Intron des ST-LH1 Genes aus Kartoffel (Vancanneyt G. et al. (1990) Mol Gen Genet 220: 245-50) mit einander verbunden sind.

20 Die cDNA, die für den AP3 Promoter (-902 bis +15) aus *Arabidopsis thaliana* kodiert, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethode aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) und der Primer PR7 (SEQ ID NO: 49) und PR10 (SEQ ID NO: 52) hergestellt.

25

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (-902 bis +15) kodiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, 30 in dem enthalten war:

- 1 µl genomischer DNA aus *A. thaliana* (1:100 verd hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 35 - 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 49)
- 0.2 mM PR10 (SEQ ID NO: 52)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

40

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

45	1X	94°C	2 Minuten
	35X	94°C	1 Minute
		50°C	1 Minute
		72°C	1 Minute
	1X	72°C	10 Minuten

## 136

Das 922 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pTAP3 erhalten. Sequenzierung des Klons pTAP3 bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion  
 5 (ein G in Position 9765 der Sequenz AL132971) und einen Basenaustausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz AL132971) von der publizierten AP3 Sequenz (AL132971, Nukleotidregion 9298 bis 10200) unterscheidet (Position 33: T statt G, Position 55: T statt G). Diese Nukleotidunterschiede wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren  
 10 somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanze.

Die modifizierte Version AP3P wurde mittels rekombinanter PCR  
 15 unter Verwendung des Plasmids pTAP3 hergestellt. Die Region 10200 bis 9771 wurde mit den Primern PR7 (SEQ ID NO: 49) und Primern PR9 (SEQ ID NO: 51) amplifiziert (Amplifikat A7/9), die Region 9526 bis 9285 wurde mit den PR8 (SEQ ID NO: 50) und PR10 (SEQ ID NO: 52) amplifiziert (Amplifikat A8/10).

20

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die für die Regionen Region 10200 bis 9771 und 9526 bis 9285 des AP3  
 25 Promoters kodieren, erfolgte in 50 µl Reaktionsansätzen, in denen enthalten war:

- 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 30 - 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 49) bzw. PR8 (SEQ ID NO: 50)
- 0.2 mM PR9 (SEQ ID NO: 51) bzw. PR10 (SEQ ID NO: 52)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

35

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
40	50°C	2 Minuten
	72°C	3 Minuten
1X	72°C	10 Minuten

Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine  
 45 Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A7/9 und A8/10, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte Version des

## 137

AP3 Promoters, AP3P, in dem die Positionen 9670 bis 9526 deletiert sind. Die Denaturierung (5 min bei 95°C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40°C) beider Amplifikate A7/9 und A8/10 erfolgte in einem 17,6 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 0.5 µg A7/9
- 0.25 µg A8/10

10 Das Auffüllen der 3'Enden (30 min bei 30°C) erfolgte in einem 20 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 17.6 µl A7/9 und A8/10-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)

15 - 50 µM dNTPs  
- 2 µl 1X Klenow Puffer  
- 2U Klenow Enzym

Die Nukleinsäure kodierend für die modifizierte Promoterversion AP3P wurde mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR7 SEQ ID NO: 49) und eines antisense spezifischen Primers (PR10 SEQ ID NO: 52) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

25

Die PCR zur Amplifikation des AP3P Fragmentes erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 30 - 0.25 mM dNTPs  
- 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 49)  
- 0.2 mM PR10 (SEQ ID NO: 52)  
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)  
- 0.25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 35 - 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
40	50°C	1 Minuten
	72°C	1 Minuten
1X	72°C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit PR7, SEQ ID NO: 49 und PR10

45 SEQ ID NO: 52 resultierte in einem 778 Bp Fragment das für die modifizierte Promoterversion AP3P kodiert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequen-



## 138

zierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz AL132971, Region 10200 bis 9298 identische Sequenz, wobei die interne Region 9285 bis 9526 deletiert wurde. Diese Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Gueri-  
 5 neu et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pTAP3P und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter AP3P anstelle  
 10 des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJAP3P.

Ein DNA-Fragment, das das PIV2 Intron des Gens ST-LS1 enthält wurde mittels PCR unter Verwendung von Plasmid-DNA p35SGUS INT (Vancanneyt G. et al. (1990) Mol Gen Genet 220: 245-50) sowie der  
 15 Primer PR40 (Seq ID NO: 54) und Primer PR41 (Seq ID NO: 55) hergestellt.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

20 Die PCR zur Amplifikation der Sequenz des Intron PIV2 des Gens ST-LS1, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl p35SGUS INT
- 25 - 0.25 mM dNTPs
- 0.2 µM PR40 (SEQ ID NO: 54)
- 0.2 µM PR41 (SEQ ID NO: 55)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 30 - 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35 35X	94°C	1 Minute
	53°C	1 Minuten
	72°C	1 Minuten
1X	72°C	10 Minuten

40 Die PCR-Amplifikation mit PR40 und PR41 resultierte in einem 206 Bp-Fragment. Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pBluntII (Invitrogen) kloniert und der Klon pBluntII-40-41 erhalten. Sequenzierungen dieses Klons mit dem Primer SP6 bestätigte eine Sequenz, die  
 45 identisch ist mit der entsprechenden Sequenz aus dem Vektor p35SGUS INT.

## 139

Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Vektor pJAP3P (oben beschrieben).

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 206 Bp SalI-BamHI  
5 Fragmentes aus pBluntII-40-41 und Ligierung mit dem SalI-BamHI  
geschnittenen Vektor pJAP3P. Der Klon, der das Intron PIV2 des  
Gens ST-LS1 in der korrekten Orientierung anschließend an das  
3'Ende des rbcS Transitpeptides enthält, heisst pJAI1 und ist ge-  
eignet, Expressionskassetten für die blütenspezifische Expression  
10 von Inverted-Repeat Transkripten herzustellen.

In der Abbildung 12 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten  
AP3P Promoter (771 bp), Fragment rbcS das rbcS Transitpeptid aus  
Erbse (204 bp), Fragment intron das Intron PIV2 des Kartoffel-  
15 Gens ST-LS1, und Fragment term (761 Bp) das Polyadenylierungs-  
signal von CaMV.

## Beispiel 11

Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die  
20 blütenspezifische Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in  
*Tagetes erecta* (gerichtet gegen die 5'Region der Epsilon-Cyclase  
cDNA)

Die Nukleinsäure, die die 5'terminale 435bp Region der Epsilon-  
25 Cyclase cDNA (Genbank accession NO: AF251016) enthält, wurde  
mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Tagetes erecta*  
cDNA unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR42  
SEQ ID NO: 56) und eines antisense spezifischen Primers (PR43  
SEQ ID NO: 57) amplifiziert. Die 5'terminale 435 bp Region der  
30 Epsilon-Cyclase cDNA aus *Tagetes erecta* setzt sich zusammen aus  
138 bp 5'Nicht-translatierter Sequenz (5'UTR) und 297 bp der dem  
N-Terminus entsprechenden kodierenden Region.

Für die Präparation von Total-RNA aus Blüten von *Tagetes* wurden  
35 100mg der gefrorenen, pulverisierten Blüten in ein Reaktionsgefäß  
überführt und in 0,8 ml Trizol-Puffer (LifeTechnologies) aufge-  
nommen. Die Suspension wurde mit 0,2 ml Chloroform extrahiert.  
Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12000 g wurde der wässrige  
Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt  
40 und mit einem Volumen Ethanol extrahiert. Die RNA wurde mit einem  
Volumen Isopropanol gefällt, mit 75 % Ethanol gewaschen und das  
Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser mit  
1/1000 Volumen Diethylpyrocarbonat bei Raumtemperatur, anschlie-  
ßend autoklaviert) gelöst. Die RNA-Konzentration wurde photome-  
45 trisch bestimmt. Für die cDNA-Synthese wurden 2.5 ug Gesamt-RNA  
für 10 min bei 60°C denaturiert, für 2 min auf Eis abgekühlt und  
mittels eines cDNA-Kits (Ready-to-go-you-prime-beads, Pharmacia

## 140

Biotech) nach Herstellerangaben unter Verwendung eines antisense spezifischen Primers (PR17 SEQ ID NO: 53) in cDNA umgeschrieben.

Die Bedingungen der anschließenden PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR42-PR43 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 435bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

10

- 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 µM PR42 (SEQ ID NO: 56)
- 0.2 µM PR43 (SEQ ID NO: 57)
- 15 - 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR zur Amplifikation des PR44-PR45 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 435 bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 25 - 0.2 µM PR44 (SEQ ID NO: 58)
- 0.2 µM PR45 (SEQ ID NO: 59)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 µl Aq. Dest.

30

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

	1X	94°C	2 Minuten
35	35X	94°C	1 Minute
		58°C	1 Minuten
		72°C	1 Minuten
	1X	72°C	10 Minuten

40 Die PCR-Amplifikation mit Primer PR42 und PR43 resultierte in einem 443 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit Primer PR44 und PR45 resultierte in einem 444 Bp-Fragment.

Die beiden Amplifikate, das PR42-PR43 (HindIII-SalI sense) Fragment und das PR44-PR45 (EcoRI-BamHI antisense) Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem

45

## 141

Primer SP6 bestätigten jeweils eine zur publizierte Sequenz AF251016 (SEQ ID NO: 38) identische Sequenz abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen. Diese Klon wurde daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungs-  
5 vektor pJAI1 (siehe Beispiel 10) verwendet.

Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 444 Bp PR44-PR45 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnit-  
10 tenen Vektor pJAI1. Der Klon, der 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase in der antisense Orientierung enthält, heisst pJAI2. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem antisense Fragment der 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase und dem Polyadenylierungssignal aus CaMV.

15

Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 443 Bp PR42-PR43 HindIII-SalI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem HindIII-SalI geschnittenen Vektor pJAI2. Der Klon, der 435 bp 5'terminale Re-  
20 gion der Epsilon-Cyclase cDNA in der sense Orientierung enthält, heisst pJAI3. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem AP3P und dem sense Fragment der 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase.

25 Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle des CHRC-Promoters wurde ein CHRC-Promoterfragment unter Verwendung genomischer DNA aus Petunie (nach Standardmethoden hergestellt) sowie der Primer PRCHRC5 (SEQ ID NO: 76) und PRCHRC3 (SEQ ID NO: 77) amplifiziert. Das Amplifikat wurde in  
30 den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen des resultierenden Klons pCR2.1-CHRC mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz AF099501 identische Sequenz. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJAI3 verwendet.

35

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1537 bp SacI-HindIII Fragments aus pCR2.1-CHRC und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJAI3. Der Klon, der den Promoter CHRC an-  
40 stelle des ursprünglichen Promoters AP3P enthält heisst pJCI3.

40

Die Herstellung der Expressionsvektoren für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P- bzw. CHRC-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

45

## 142

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AI3 wurde das 2622 bp SacI-XhoI Fragment aus pJAI3 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 13, Konstruktkarte).

- 5 In der Abbildung 13 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment 5sense die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Sense-Orientierung, Fragment intron das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment 5anti die 5'Region der Epsilon-cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in antisense Orientierung, und Fragment term (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

- Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5CI3 wurde das 3394 bp SacI-XhoI Fragment aus pJCI3 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 14, Konstruktkarte).

- In der Abbildung 14 beinhaltet Fragment CHRC den Promoter (1537 bp), Fragment 5sense die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Sense-Orientierung, Fragment intron das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment 5anti die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Antisense-Orientierung, und Fragment term (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

## 25 Beispiel 12

Herstellung einer Inverted-Repeat-Expressionskassette für die blütenspezifische Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta* (gerichtet gegen die 3'Region der Epsilon-Cyclase cDNA)

## 30

- Die Nukleinsäure, die die 3'terminale Region (384 bp) der Epsilon-Cyclase cDNA (Genbank accession NO: AF251016) enthält wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Tagetes erecta* cDNA unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR46 SEQ ID NO: 60) und eines antisense spezifischen Primers (PR47 SEQ ID NO: 61) amplifiziert. Die 3'terminale Region (384 bp) der Epsilon-Cyclase cDNA aus *Tagetes erecta* setzt sich zusammen aus 140 bp 3'-Nicht-translatierter Sequenz (3'UTR) und 244 bp der dem C-Terminus entsprechenden kodierenden Region.

## 40

Die Präparation von Total-RNA aus Blüten von *Tagetes* erfolgte wie unter Beispiel 11 beschrieben.

- Die cDNA Synthese erfolgte wie unter Beispiel 11 unter Verwendung des antisense spezifischen Primers PR17 (SEQ ID NO: 53) beschrieben.

## 143

Die Bedingungen der anschließenden PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR46-PR457 DNA-Fragmentes, das die 3'terminale 384 bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 10 - 0.2 µM PR46 (SEQ ID NO: 60)
- 0.2 µM PR47 (SEQ ID NO: 61)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 µl Aq. Dest.

15

Die PCR zur Amplifikation des PR48-PR49 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 384 bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 20 - 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 µM PR48 (SEQ ID NO: 62)
- 0.2 µM PR49 (SEQ ID NO: 63)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 25 - 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

30

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	58°C	1 Minuten
	72°C	1 Minuten
35 1X	72°C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 60 und SEQ ID NO: 61 resultierte in einem 392 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 62 und SEQ ID NO: 63 resultierte in einem 396 Bp-Fragment.

40

Die beiden Amplifikate, das PR46-PR47 Fragment und das PR48-PR49 Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine zur publizierten Sequenz AF251016 (SEQ ID NO: 38) identische Sequenz abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen. Diese Klone wurde

45

## 144

daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel 10) verwendet.

Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 396 Bp  
5 PR48-PR49 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-  
BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnit-  
tenen Vektor pJAI1. Der Klon, der 3'terminale Region der Epsilon-  
Cyclase in der antisense Orientierung enthält, heisst pJAI4.  
Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwi-  
10 schen dem Antisense-Fragment der 3'terminale Region der Epsilon-  
Cyclase und dem Polyadenylierungssignal aus CaMV.

Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 392  
Bp PR46-PR47 HindIII-SalI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor  
15 pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem HindIII-SalI ge-  
schnittenen Vektor pJAI4. Der Klon, der 392 bp 3'terminale Region  
der Epsilon-Cyclase cDNA in der sense Orientierung enthält,  
heisst pJAI5. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle  
Fusion zwischen dem AP3P und dem Sense-Fragment 3'terminale Re-  
20 gion der Epsilon-Cyclase.

Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacterium-  
vermittelte Transformation des AP3P-kontrollierten Inverted-Re-  
peat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung  
25 des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900). Zur Herstellung des Ex-  
pressionsvektors pS5AI5 wurde das 2523 bp SacI-XhoI Fragment aus  
pJAI5 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Ab-  
bildung 15, Konstruktkarte).

30 In der Abbildung 15 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten  
AP3P Promoter (771 bp), Fragment 3sense die 3'region der Epsilon  
cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in sense Orientierung, Frag-  
ment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment  
3anti die 3'region der Epsilon cyclase aus *Tagetes erecta* (435  
35 bp) in antisense Orientierung, und Fragment *term* (761 Bp) das Po-  
lyadenylierungssignal von CaMV.

## Beispiel 13

## Klonierung des Epsilon-Cyclase Promoters

40

Ein 199 bp Fragment bzw. das 312 bp Fragment des Epsilon-Cyclase  
Promoters wurde durch zwei unabhängige Klonierungsstrategien, In-  
verse PCR (adaptiert Long et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 90:  
10370) und TAIL-PCR (Liu Y-G. et al. (1995) Plant J. 8: 457-463)  
45 unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethode aus *Tage-  
tes erecta*, Linie Orangenprinz, isoliert) isoliert.

## 145

Für den Inverse PCR-Ansatz wurden 2 µg genomische DNA in einem 25 µl Reaktionsansatz mit EcoRV und RsaI verdaut, anschließend auf 300 µl verdünnt und über Nacht bei 16°C mit 3U Ligase religiert. Unter Verwendung der Primer PR50 (SEQ ID NO: 64) und PR51 (SEQ ID NO: 65) wurde durch PCR Amplifikation ein Fragment hergestellt, das, jeweils in Sense-Orientierung, 354 bp der Epsilon-Cyclase cDNA (Genbank Accession AF251016), ligiert an 300 bp des Epsilon-Cyclase Promoters sowie 70 bp des 5'terminalen Bereichs der cDNA Epsilon-Cyclase enthält (siehe Abbildung 16).

10

Die Bedingungen der PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR50-PR51 DNA-Fragmentes, das unter anderem das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl Ligationsansatz (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 µM PR50 (SEQ ID NO: 64)
- 20 - 0.2 µM PR51 (SEQ ID NO: 65)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 µl Aq. Dest.

25 Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
30	53°C	1 Minute
	72°C	1 Minute
1X	72°C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR50 und PR51 resultierte in einem 734 Bp-Fragment, das unter anderem das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält (Abbildung 16).

Das Amplifikat, wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern M13 und T7 ergaben die Sequenz SEQ ID NO: 45. Diese Sequenz wurde in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten *Tagetes erecta* Linie Orangenprinz.

45



**146**

Für den TAIL-PCR Ansatz wurden drei sukzessive PCR-Reaktionen mit jeweils unterschiedlichen gen-spezifischen Primern (nested primers) durchgeführt.

**5** Die TAIL1-PCR erfolgte in einem 20 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ng genomische DNA (hergestellt wie oben beschrieben)
  - 0.2 mM jedes dNTPs
  - 10** - 0.2 µM PR60 (SEQ ID NO: 66)
  - 0.2 µM AD1 (SEQ ID NO: 69)
  - 2 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
  - 0.5 U R Taq Polymerase (TAKARA)
  - mit Aq. Dest. auf 20 µl aufgefüllt
- 15**
- AD1 stellte dabei zunächst eine Mischung aus Primern der Sequenzen (a/c/g/t)tcga(g/c)t(a/t)t(g/c)g(a/t)gtt dar.

Die PCR-Reaktion TAIL1 wurden unter folgenden Zyklusbedingungen  
**20** durchgeführt:

- 1X 93°C: 1 Minute, 95°C: 1 Minute
- 5X 94°C: 30 Sekunden, 62°C: 1 Minute, 72°C: 2.5 Minuten
- 1X 94°C: 30 Sekunden, 25°C: 3 Minuten, ramp to 72°C in 3 Minuten,
- 25** 72°C: 2.5 Minuten
- 15X 94°C: 10 Sekunden, 68°C: 1 Minute, 72°C: 2.5 Minuten;
- 94°C: 10 Sekunden, 68°C: 1 Minute, 72°C: 2.5 Minuten;
- 94°C: 10 Sekunden, 29°C: 1 Minute, 72°C: 2.5 Minuten
- 1X 72°C: 5 Minuten

**30**

Die TAIL2-PCR erfolgte in einem 21 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl einer 1:50 Verdünnung des TAIL1-Reaktionsansatzes (herges-
- 35** tellt wie oben beschrieben)
- 0.8 mM dNTP
- 0.2 µM PR61 (SEQ ID NO: 67)
- 0.2 µM AD1 (SEQ ID NO: 69)
- 2 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 40** - 0.5 U R Taq Polymerase (TAKARA)
- mit Aq. Dest. auf 21 µl aufgefüllt

## 147

Die PCR-Reaktion TAIL2 wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 12X 94°C: 10 Sekunden, 64°C: 1 Minute, 72°C: 2.5 Minuten;  
 5 94°C: 10 Sekunden, 64°C: 1 Minute, 72°C: 2.5 Minuten;  
 94°C: 10 Sekunden, 29°C: 1 Minute, 72°C: 2.5 Minuten  
 1X 72°C: 5 Minuten

Die TAIL3-PCR erfolgte in einem 100 µl Reaktionsansatz, in dem en-  
 10 thalten war:

- 1 µl einer 1:10 Verdünnung des TAIL2-Reaktionsansatzes (hergestellt wie oben beschrieben)
- 15 - 0.8 mM dNTP
- 0.2 µM PR63 (SEQ ID NO: 68)
- 0.2 µM AD1 (SEQ ID NO: 69)
- 10 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.5 U R Taq Polymerase (TAKARA)
- 20 - mit Aq. Dest. auf 100 µl aufgefüllt

Die PCR-Reaktion TAIL3 wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 25 20X 94°C: 15 Sekunden, 29°C: 30 Sekunden, 72°C: 2 Minuten  
 1X 72°C: 5 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR63 und AD1 resultierte in einem 280 Bp-Fragment, das unter anderem das 199 bp Promoter-  
 30 fragment der Epsilon-Cyclase enthält (Abbildung 17).

Das Amplifikat, wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern M13 und T7 ergaben die Sequenz  
 35 SEQ ID NO: 46. Diese Sequenz ist identisch mit der Sequenz SEQ ID NO: 45, die mit der IPCR Strategie isoliert wurde und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten *Tagetes erecta* Linie Orangenprinz.

40 Der pCR2.1-Klon, der das 312 bp Fragment (SEQ ID NO: 45) des Epsilon-Cyclase Promoters, das durch die IPCR-Strategie isoliert wurde, enthält, heisst pTA-ecycP und wurde für die Herstellung der IR Konstrukte verwendet.

## 148

## Beispiel 14

Herstellung einer Inverted-Repeat-Expressionskassette für die blütenspezifische Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta* (gerichtet gegen die Promoterregion der Epsilon-Cy-  
 5 clase cDNA).

Die Expression von Inverted-Repeat Transkripten bestehend aus Promoterfragmenten der Epsilon-cyclase in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezi-  
 10 fischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis* (siehe Beispiel 10) oder des blütenspezifischen Promoters CHRC (Genbank accession NO: AF099501). Das Inverted-Repeat Transkript enthält jeweils ein Epsilon-Cyclase-Promoterfragment in korrekter Orientierung (Sense-Fragment) und ein sequenzidentisches Epsilon-Cyclase-  
 15 Promoterfragment in entgegengesetzter Orientierung (Antisense-Fragment), die durch ein funktionelles Intron (siehe Beispiel 10) mit einander verbunden sind.

Die Promoterfragmente wurde mittels PCR unter Verwendung von  
 20 Plasmid-DNA (Klon pTA-ecycP, siehe Beispiel 13 ) und der Primer PR124 (SEQ ID NO: 70) und PR126 (SEQ ID NO: 72) bzw. der Primer PR125 (SEQ ID NO: 71) und PR127 (SEQ ID NO: 73) hergestellt.

Die Bedingungen der PCR-Reaktionen waren die folgenden:

25

Die PCR zur Amplifikation des PR124-PR126 DNA-Fragmentes, das das Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 30 - 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 µM PR124 (SEQ ID NO: 70)
- 0.2 µM PR126 (SEQ ID NO: 72)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 35 - 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR zur Amplifikation des PR125-PR127 DNA-Fragmentes, das das 312bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in  
 40 einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 µM PR125 (SEQ ID NO: 71)
- 45 - 0.2 µM PR127 (SEQ ID NO: 73)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)

- 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

5			
	1X	94°C	2 Minuten
	35X	94°C	1 Minute
		53°C	1 Minuten
		72°C	1 Minuten
10	1X	72°C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR124 und PR126 resultierte in einem 358 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit Primer PR125 und PR127 resultierte in einem 361 Bp-Fragment.

15

Die beiden Amplifikate, das PR124-PR126 (HindIII-SalI sense) Fragment und das PR125-PR127 (EcoRI-BamHI antisense) Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen

20

mit dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine Sequenz, die abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen identisch ist zu SEQ ID NO: 45. Diese Klone wurden daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel 10) verwendet.

25

Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 358 Bp PR124-PR126 HindIII-SalI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAI1. Der Klon, das Epsilon-Cyclase Promoter-fragment in der sense Orientierung enthält, heisst cs43. Durch die Ligation wird das Sense-Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters zwischen den AP3P Promoter und das Intron eingefügt.

30

Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 361Bp PR125-PR127 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor cs43. Der Klon, der das Epsilon-Cyclase Promoterfragment in der antisense Orientierung enthält, heisst cs44. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem Intron und dem Antisense-Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters.

35

40

Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle des CHRC-Promoters wurde ein CHRC-Promoterfragment unter Verwendung genomischer DNA aus Petunie (nach Standardmethoden hergestellt) sowie der Primer PRCHRC3' (SEQ ID NO: 77) und PRCHRC5' (SEQ ID NO: 76) amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzie-

45

## 150

rungen des resultierenden Klons pCR2.1-CHRC mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz AF099501 identische Sequenz. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor cs44 verwendet.

5

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1537 bp SacI-HindIII Fragments aus pCR2.1-CHRC und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor cs44. Der Klon, der den Promoter CHRC anstelle des ursprünglichen Promoters AP3P enthält heisst cs45.

10

Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle zweier Promotoren, des CHRC-Promoter und des AP3P-Promoters, wurde der AP3P-Promoter in antisense Orientierung an den 3' Terminus des Epsilon-Cyclase antisense Fragmentes in

15

cs45 kloniert. Das AP3P-Promoterfragments aus pJAI1 wurde unter Verwendung der Primer PR128 und PR129 amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Die Sequenzierung mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur

20

pCR2.1-AP3PSX wurde für Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle zweier Promotoren verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 bp SalI-XhoI Fragments aus pCR2.1-AP3PSX und Ligierung in den XhoI geschnittenen Vektor cs45. Der Klon, der 3'seitig des Inverted Repeats, den Promoter AP3P in antisense Orientierung enthält heisst cs46.

25

Die Herstellung der Expressionsvektoren für die Agrobacterium-vermittelte Transformation des AP3P-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

30

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AI7 wurde das 1685bp SacI-XhoI Fragment aus cs44 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 18, Konstruktkarte). In der Abbildung 18 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment *P-sense* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), und Fragment *P-anti* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in antisense Orientierung.

40

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5CI7 wurde das 2445bp SacI-XhoI Fragment aus cs45 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 19, Konstruktkarte).

45

## 151

In der Abbildung 19 beinhaltet Fragment *CHRC* den *CHRC*-Promoter (1537 bp), Fragment *P-sense* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens *ST-LS1*), und Fragment *P-anti* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in antisense Orientierung.

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5CAI7 wurde das 3219bp *SacI*-*XhoI* Fragment aus *cs46* mit dem *SacI*-*XhoI* geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 20, Konstruktkarte)

10

In der Abbildung 20 beinhaltet Fragment *CHRC* den *CHRC*-Promoter (1537 bp), Fragment *P-sense* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens *ST-LS1*), Fragment *P-anti* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in antisense Orientierung und das Fragment *AP3P* das 771 bp *AP3P*-Promoterfragment in antisense Orientierung.

## Beispiel 15

Herstellung transgener *Tagetes* Pflanzen mit reduzierter  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität

*Tagetessamen* werden sterilisiert und auf Keimungsmedium (MS-Medium; Murashige and Skoog, *Physiol. Plant.* 15(1962), 473-497) pH 5,8, 2 % Saccharose) aufgelegt. Die Keimung erfolgt in einem Temperatur/Licht/Zeitintervall von 18 bis 28°C / 20 bis 200  $\mu$ E / 3 bis 16 Wochen, bevorzugt jedoch bei 21°C, 20 bis 70  $\mu$ E, für 4 bis 8 Wochen.

Alle Blätter der sich bis dahin entwickelten *in vitro* Pflanzen werden geerntet und quer zur Mittelrippe geschnitten. Die dadurch entstehenden Blattexplantate mit einer Größe von 10 bis 60 mm<sup>2</sup> werden im Verlaufe der Präparation in flüssigem MS-Medium bei Raumtemperatur für maximal 2 h aufbewahrt.

35

Der Agrobakterium *tumefaciens* Stamm EHA105 wurde mit dem Binärplasmid pS5AI3 transformiert. Die Anzucht des transformierten *A. tumefaciens* Stammes EHA105 erfolgte über Nacht unter folgenden Bedingungen: Eine Einzelkolonie wurde in YEB (0,1 % Hefeextrakt, 0,5 % Rindfleischextrakt, 0,5 % Pepton, 0,5 % Saccharose, 0,5 % Magnesiumsulfat x 7 H<sub>2</sub>O) mit 25 mg/l Kanamycin angeimpft und bei 28°C für 16 bis 20 h angezogen. Anschließend wurde die Bakterien-suspension durch Zentrifugation bei 6000 g für 10 min geerntet und derart in flüssigem MS Medium resuspendiert, das eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,1 bis 0,8 entstand. Diese Suspension wurde für die Co-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet.

## 152

Unmittelbar vor der Co-Kultivierung wird das MS-Medium, in dem die Blätter aufbewahrt worden sind, durch die Bakteriensuspension ersetzt. Die Inkubation der Blättchen in der Agrobakteriensuspension erfolgte für 30 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Anschließend werden die infizierten Explantate auf ein mit Agar (z.B. 0,8 % Plant Agar (Duchefa, NL) verfestigtes MS-Medium mit Wachstumsregulatoren, wie beispielsweise 3 mg/l Benzylaminopurin (BAP) sowie 1 mg/l Indolyllessigsäure (IAA) aufgelegt. Die Orientierung der Blätter auf dem Medium ist bedeutungslos. Die Kultivierung der Explantate findet für 1 bis 8 Tage, bevorzugt aber für 6 Tage statt, dabei können folgende Bedingungen angewendet werden: Lichtintensität: 30 bis 80  $\mu\text{Mol/m}^2 \times \text{sec}$ , Temperatur: 22 bis 24°C, hell/dunkel Wechsel von 16/8 Stunden. Anschließend werden die co-kultivierten Explantate auf frisches MS-Medium, bevorzugt mit den gleichen Wachstumsregulatoren übertragen, wobei dieses zweite Medium zusätzlich ein Antibiotikum zur Unterdrückung des Bakterienwachstums enthält. Timentin in einer Konzentration von 200 bis 500 mg/l ist für diesen Zweck sehr geeignet. Als zweite selektive Komponente wird eine für die Selektion des Transformationserfolges eingesetzt. Phosphinothricin in einer Konzentration von 1 bis 5 mg/l selektiert sehr effizient, aber auch andere selektive Komponenten gemäß des zu verwendenden Verfahrens sind denkbar.

Nach jeweils ein bis drei Wochen erfolgt der Transfer der Explantate auf frisches Medium bis sich Sprossknospen und kleine Sprosse entwickeln, die dann auf das gleiche Basalmedium einschließlich Timentin und PPT oder alternative Komponenten mit Wachstumsregulatoren, nämlich z.B. 0,5 mg/l Indolylbuttersäure (IBA) und 0,5 mg/l Gibberillinsäure  $\text{GA}_3$ , zur Bewurzelung übertragen werden. Bewurzelte Sprosse können ins Gewächshaus überführt werden.

Zusätzlich zu der beschriebenen Methode sind folgende vorteilhafte Modifikationen möglich:

- Bevor die Explantate mit den Bakterien infiziert werden, können sie für 1 bis 12 Tage, bevorzugt 3 bis 4, auf das oben beschriebene Medium für die Co-Kultur vorinkubiert werden. Anschließend erfolgt die Infektion, Co-Kultur und selektive Regeneration wie oben beschrieben.
- Der pH Wert für die Regeneration (normalerweise 5,8) kann auf pH 5,2 gesenkt werden. Dadurch wird die Kontrolle des Agrobakterienwachstums verbessert.

## 153

- Die Zugabe von AgNO<sub>3</sub> (3 - 10 mg/l) zum Regenerationsmedium verbessert den Zustand der Kultur einschließlich der Regeneration selbst.
- 5 • Komponenten, die die Phenolbildung reduzieren und dem Fachmann bekannt sind, wie z.B. Zitronensäure, Ascorbinsäure, PVP u.v.a.m., wirken sich positiv auf die Kultur aus.
- Für das gesamte Verfahren kann auch flüssiges Kulturmedium Verwendung finden. Die Kultur kann auch auf handelsüblichen Trägern, die auf dem flüssigen Medium positioniert werden inkubiert werden.

Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden  
15 mit dem Expressionskonstrukt pS5AI3 folgende Linien erhalten:

CS30-1, CS30-3 und CS30-4

- 20 Beispiel 16:  
Charakterisierung der transgenen Tagetes Pflanzen mit reduzierter  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität

Das Blütenmaterial der transgenen Tagetes erecta Pflanzen aus  
25 Beispiel 15 wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und das Pulver (etwa 250 bis 500 mg) mit 100 % Aceton extrahiert (dreimal je 500  $\mu$ l). Das Lösungsmittel wurde evaporiert und die Carotinoide in 100  $\mu$ l Aceton resuspendiert.

- 30 Mittels einer C30-reverse phase-Säule konnten die individuellen Carotinoide quantifiziert werden. Die HPLC-Laufbedingungen waren nahezu identisch mit einer publizierten Methode (Frazer et al. (2000), Plant Journal 24(4): 551-558). Eine Identifizierung der Carotinoide war aufgrund der UV-VIS-Spektren möglich.

- 35 Tabelle 2 zeigt das Carotinoidprofil in Tagetespetalen der gemäß der vorstehend beschriebenen Beispiele hergestellten transgenen Tagetes- und Kontrolltagetespflanzen. Alle Carotinoidmengen sind in [ $\mu$ g/g] Frischgewicht angegeben, prozentuale Veränderungen  
40 gegenüber der Kontrollpflanze sind in Klammern angegeben.

- Im Vergleich zur genetisch nicht veränderten Kontrollpflanze, weisen die genetisch veränderten Pflanzen mit reduzierter  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität einen deutlich erhöhten Gehalt an Carotinoiden des " $\beta$ -Carotin-Weges", wie beispielsweise  $\beta$ -Carotin  
45 und Zeaxanthin und einen deutlich reduzierten Gehalt an



## 154

Carotinoiden des " $\alpha$ -Carotin-Weges", wie beispielsweise Lutein auf.

Tabelle 2

5

10

Pflanze	Lutein	b-Carotin	Zeaxanthin	Violaxanthin	Gesamt-Carotinoide
Kontrolle	260	4,8	2,7	36	304
CS 30-1	35 (-86%)	13 (+170%)	4,4 (+62%)	59 (+63%)	111 (-63%)
Kontrolle	456	6,4	6,9	58	527
CS 30-3	62 (-86%)	13 (+103%)	8,9 (+29%)	75 (+29%)	159 (-70%)
CS 30-4	68 (-85%)	9,1 (+42%)	5,7 (-17%)	61 (+5%)	144 (-73%)

## 15 Beispiel 17:

Charakterisierung transgener Tagetespflanzen, die Astaxanthin in Blütenblättern akkumulieren

Das Blütenmaterial der transgenen *Tagetes erecta* Pflanzen (aus  
20 Beispiel 7 mit Plasmid pS5AP3PKETO2) wird in flüssigem Stickstoff  
gemörkert und das Pulver (etwa 30-100 mg) mit 100% Aceton extra-  
hiert (dreimal je 500  $\mu$ l). Das Lösungsmittel wird evaporiert,  
die Carotinoide in 30  $\mu$ l Petrolether:Aceton (Verhältnis 5:1)  
resuspendiert und auf einer Silica-Dünnschichtplatte aufgetrennt.

25 Tagetespflanzen mit zusätzlichen roten Carotinoidbanden, die  
in Kontrollpflanzen nicht auftreten, wurden für präparativ-analy-  
tische Analysen ausgewählt. Für analytische Details siehe Bei-  
spiel 9.

30 Mittels einer C30-Reverse phase-Säule konnten die individuellen  
Carotinoide quantifiziert werden. Für analytische Details siehe  
Beispiel 9.

35 Tabelle 3 zeigt das Carotinoidprofil in Tagetespetalen der gemäß  
der vorstehend beschriebenen Beispiele hergestellten transgenen  
Tagetes- und Kontrolltagetespflanzen. Carotinoidkonzentrationen  
sind prozentual auf den Gehalt an Gesamtcarotinoiden bezogen.

40 Im Vergleich zur genetisch nicht veränderten Kontrollpflanzen  
weisen die genetisch veränderten Pflanzen, die eine Ketolase  
exprimieren, einen Gehalt an Astaxanthin auf.

## 155

Tabelle 3: Prozentuale Carotinoidkonzentrationen in Astaxanthin synthetisierenden Tagetes und Kontrollpflanzen

5	Tagetes plant	Ant-hera-xanthin	Lutein	Zea-xanthin	Crypto-xanthin	Beta/zeta-carotene	Asta-xanthin	Adoni-rubin	3'-Hydroxy-echine-none	3-Hydroxy-echine-none
	control	1,5	93,6	1,2	0,3	3,8				
	cs19-3	1,3	94,2	1,1	0,3	3,5	0,1		0,05	0,01
10	CHRC::Ketolase	1,3-1,5	93,5-94,4	0,9-1,7	0,01-0,02	2-3,1	0,3-0,9	0,03-0,2	0,2	0-0,01
	DFR-A::Ketolase	4,5	91,8	1,1		2,4	0,2	0,02	0,07	

## 15 Beispiel 18:

Charakterisierung transgener Tagetespflanzen, die eine verringerte Luteinkonzentration aufweisen und Astaxanthin in Blütenblättern akkumulieren

20 Tagetespflanzen, die durch Verwendung des AP3P-Promoters und der Ketolase aus *Haematococcus* in Blütenblättern Astaxanthin synthetisieren (siehe experimentelle Einzelheiten zu pS5AP3PKETO2 in Beispiel 5A) und Tagetespflanzen, die durch Verwendung des RNAi-Konstruktes pS5AI3 (siehe Beispiel 11, Abbildung 13) mittels

25 AP3P-Promoter geringere Mengen an Lutein akkumulieren, wurden gekreuzt. Samen wurden gekeimt und die Nachkommenschaft molekularbiologisch und biochemisch analysiert.

Die Anwesenheit der entsprechenden Expressionskassetten wird  
30 durch genomische PCR untersucht. Dazu wird junges Blattmaterial geerntet und zur Isolierung genomischer DNA verwendet.

Die Integrität der DNA Präparation wird durch Amplifikation eines endogenen Genabschnittes aus der Tagetes Ecyclase, welches  
35 in keinem der Expressionskassetten enthalten ist, mittels Forwardprimer PR29 (PR29: 5'-ccatttctcataggtcgtgc-3') und Reverseprimer PR78 (PR78: 5'-gcaagcctgcatggaattgtg-3') kontrolliert. Diese PCR-Reaktion resultiert bei intakter genomischer DNA in einem 0.6 kb-Fragment.

40

Die Ketolase-Expressionskassette lässt sich durch genomische PCR mittels Forwardprimer PR7 (PR7: 5'-gagtcactcactgatttcattgcttg-3') und Reverseprimer PR185 (PR185: 5'-cattaagctgctgtttctca-3') nachweisen. Diese PCR-Reaktion führt bei Anwesen-  
45 heit, nicht bei Abwesenheit, der Ketolase-Expressionskassette zur Produktion eines 0,4 kb-Fragmentes.

## 156

Die Ecyclase-Runterregulierungskassette laesst sich durch genomische PCR mittels Forwardprimer PR7 und Reverseprimer PR41 (PR41: 5'-ggatccggtgatacctgcacatcaac-3') nachweisen. Diese PCR-Reaktion fuehrt bei Anwesenheit, nicht bei Abwesenheit, der

5 Ecyclase-Runterregulierungskassette zur Produktion eines 1,4 kb-Fragmentes.

Die Bedingungen der PCR-Reaktionen sind die folgenden:

10 Die PCR zur Amplifikation der beschriebenen Fragmente erfolgt jeweils in einem 50 ul? Reaktionsansatz, in dem enthalten ist:

- 1 ul? cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 15 - 0.2 uM jeweiliger Forwardprimer
- 0.2 uM jeweiliger Forwardprimer
- 5 ul? 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ul? R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ul? Aq. Dest.

20

Die PCR-Reaktionen werden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgefuehrt und anschliessend Agarosegelelektrophorese analysiert.

25	1X	94°C	2 Minuten
	35X	94°C	1 Minute
		58°C	1 Minuten
		72°C	1 Minuten
	1X	72°C	10 Minuten

30

Für das biochemische Screening wird das Blütenmaterial der Tagetes erecta Pflanzen in flüssigem Stickstoff gemörsert und das Pulver (etwa 30 bis 100 mg) mit 100% Aceton extrahiert (dreimal je 500 ul). Das Lösungsmittel wird evaporiert, die Carotinoide in

35 30 µl Petrolether:Aceton (Verhältnis 5:1) resuspendiert und auf einer Silica-Dünnschichtplatte aufgetrennt. Tagetespflanzen mit roten Carotinoidbanden, die auf Astaxanthinsynthese schließen lassen, und gleichzeitig weniger intensiven Banden für Luteinester (eine der mobilsten Banden in der Nähe der Laufmittelfront)

40 wurden für präparativ-analytische Analysen ausgewählt. Mittels Esterhydrolyse durch Lipasebehandlung und Auftrennung des Carotinoidgemisches mittels HPLC konnten die individuellen Carotinoide quantifiziert werden. Für analytische Details siehe Beispiel 9.

45

## 157

Tabelle 4 zeigt das Carotinoidprofil in Tagetespetalen der gemäß der vorstehend beschriebenen Beispiele durch Kreuzung hergestellten transgenen Tagetespflanzen. Carotinoidkonzentrationen sind prozentual auf den Gehalt an Gesamtcarotinoiden bezogen.

5

Im Vergleich zur genetisch nicht veränderten Kontrollpflanzen weisen die genetisch veränderten Pflanzen mit reduzierter epsilon-Cyclase-Aktivität und gleichzeitiger Synthese von Astaxanthin i) einen deutlich erhöhten Gehalt an Carotinoiden des „ $\beta$ -Carotin-Weges“, wie beispielsweise  $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin, ii) einen deutlich reduzierten Gehalt an Carotinoiden des „ $\alpha$ -Carotin-Weges“, wie beispielsweise Lutein auf, und iii) Akkumulation von Astaxanthin.

15 Tabelle 4: Prozentuale Carotinoidkonzentrationen in transgenen Tagetes- und Kontrollpflanzen

20 Tagetes plant	Viola-xanthin	Anthera-xanthin	Lutein	Zea-xanthin	Crypto-xanthin	Beta/zeta-carotene	Asta-xanthin	3'-Hydroxy-echinenone	3-Hydroxy-echinenone
control		1,5	93,6	1,2	0,3	3,8			
T109-26	0,6	2,1	65,9	10,4	0,1	19,9	0,3	0,7	0,08
T105-8		3	67,3	8,2	0,1	20,7	0,05	0,4	
T112-5		2,1	48,4	43,6	0,08	5,3	0,05	0,5	

25

Beispiel 19:

Amplifikation einer DNA, die die gesamte Primärsequenz der NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 kodiert

30 Die DNA, die für die NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 kodiert, wurde mittels PCR aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 (Stamm der "American Type Culture Collection") amplifiziert.

35 Für die Präparation von genomischer DNA aus einer Suspensionskultur von *Nostoc punctiforme* ATCC 29133, die 1 Woche mit Dauerlicht und konstantem Schütteln (150 rpm) at 25°C in BG 11-Medium (1,5 g/l NaNO<sub>3</sub>, 0,04 g/l K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, 0,075 g/l MgSO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O, 0,036 g/l CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,006 g/l citric acid, 0,006 g/l Ferric ammonium

40 citrate, 0,001 g/l EDTA disodium magnesium, 0,04 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1 ml Trace Metal Mix "A5+Co" (2,86 g/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1,81 g/l MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0,222 g/l ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,39 g/l NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,079 g/l CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0,0494 g/l Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O) gewachsen war, wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und

45 im Mörser pulverisiert.

## 158

Protokoll für die DNA-Isolation aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133:

Aus einer 10 ml Flüssigkultur wurden die Bakterienzellen durch  
5 10minütige Zentrifugation bei 8000 rpm pelletiert. Anschließend  
wurden die Bakterienzellen in flüssigem Stickstoff mit einem  
Mörser zerstoßen und gemahlen. Das Zellmaterial wurde in 1 ml  
10mM Tris\_HCl (pH 7.5) resuspendiert und in ein Eppendorf-Reak-  
tionsgefäß (2ml Volumen) überführt. Nach Zugabe von 100 µl Pro-  
10 teinase K (Konzentration: 20 mg/ml) wurde die Zellsuspension für  
3 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension  
mit 500 µl Phenol extrahiert. Nach 5minütiger Zentrifugation bei  
13000 upm wurde die obere, wässrige Phase in ein neues 2-ml-  
Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion mit Phenol  
15 wurde 3mal wiederholt. Die DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Volu-  
men 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 0,6 Volumen Isopropanol ge-  
fällt und anschließend mit 70 % Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet  
wurde bei Raumtemperatur getrocknet, in 25 µl Wasser aufgenommen  
und unter Erhitzung auf 65°C gelöst.

20

Die Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase aus *Nostoc punctiforme*  
ATCC 29133, wurde mittels "polymerase chain reaction" (PCR) aus  
*Nostoc punctiforme* ATCC 29133 unter Verwendung eines sense-spezi-  
fischen Primers (NP196-1, SEQ ID No. 129) und eines antisense-  
25 spezifischen Primers (NP196-2 SEQ ID No. 130) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die für ein Ketolase Protein  
30 bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert, erfolgte in  
einem 50 ul Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ul einer *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 DNA (hergestellt wie  
oben beschrieben)
- 35 - 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM NP196-1 (SEQ ID No. 129)
- 0.2 mM NP196-2 (SEQ ID No. 130)
- 5 ul 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ul R Taq Polymerase (TAKARA)
- 40 - 25.8 ul Aq. Dest.

45

## 159

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

	1X	94°C	2 Minuten
	35X	94°C	1 Minute
5		55°C	1 Minuten
		72°C	3 Minuten
	1X	72°C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 129 und SEQ ID No. 130 resultierte in einem 792 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert (NP196, SEQ ID No. 131). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und der Klon pNP196 erhalten.

15 Sequenzierung des Klons pNP196 mit dem M13F- und dem M13R-Primer bestätigte eine Sequenz, welche mit der DNA-Sequenz von 140.571-139.810 des Datenbank-eintrages NZ\_AABC01000196 identisch ist (inverse orientiert zum veröffentlichten Datenbankeintrag) mit 20 der Ausnahme, daß G in Position 140.571 durch A ersetzt wurde, um ein Standard-Startkodon ATG zu erzeugen. Diese Nukleotidsequenz wurde in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Nostoc punctiforme* ATCC 29133.

25 Dieser Klon pNP196 wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

30 pJIT117 wurde modifiziert, indem der 35S-Terminator durch den OCS-Terminator (Octopine Synthase) des Ti-Plasmides pTi15955 von *Agrobacterium tumefaciens* (Datenbankeintrag X00493 von Position 12,541-12,350, Gielen et al. (1984) EMBO J. 3 835-846) ersetzt wurde.

35 Das DNA-Fragment, das die OCS-Terminatorregion beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung des Plasmides pHELLSGATE (Datenbankeintrag AJ311874, Wesley et al. (2001) Plant J. 27 581-590, nach Standardmethoden aus *E.coli* isoliert) sowie der Primer OCS-1 40 (SEQ ID No. 133) und OCS-2 (SEQ ID No. 134) hergestellt.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die die Octopin Synthase (OCS) Terminatorregion (SEQ ID No. 135) beinhaltet, erfolgte in einem 45 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten waren:

## 160

- 100 ng pHELLSGATE plasmid DNA
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM OCS-1 (SEQ ID No. 133)
- 0.2 mM OCS-2 (SEQ ID No. 134)
- 5 - 5 ul? 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 ul? Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 ul? Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

10

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	50°C	1 Minute
	72°C	1 Minute
15 1X	72°C	10 Minuten

Das 210 bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pOCS erhalten.

20

Sequenzierung des Klons pOCS bestätigte eine Sequenz, die mit einem Sequenzabschnitt auf dem Ti-Plasmid pTi15955 von *Agrobacterium tumefaciens* (Datenbankeintrag X00493) von Position 12.541 bis 12.350 übereinstimmt.

25

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 210 bp SalI-XhoI Fragmentes aus pOCS und Ligierung in den SalI-XhoI geschnittenen Vektor pJIT117.

30 Dieser Klon heisst pJO und wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJONP196 verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 782 Bp SphI-Fragmentes aus pNP196 und Ligierung in den SphI geschnittenen Vektor pJO. Der Klon, der die NP196-Ketolase von *Nostoc punctiforme* in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJONP196.

Beispiel 20:

40 Herstellung von Expressionsvektoren zur konstitutiven Expression der NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.

Die Expression der NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* in  
 45 *L. esculentum* und in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle des konstitutiven Promoters FNR (Ferredoxin-NADPH- Oxidoreductase, Datenbankeintrag AB011474 Position 70127 bis 69493; WO03/006660),

## 161

aus *Arabidopsis thaliana*. Das FNR-Gen beginnt bei Basenpaar 69492 und ist mit "Ferredoxin-NADP+ Reductase" annotiert. Die Expression erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715).

5

Das DNA Fragment, das die FNR Promotorregion aus *Arabidopsis thaliana* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethoden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) sowie der Primer FNR-1 (SEQ ID No. 136) und FNR-2 (SEQ ID No. 137) hergestellt.

10

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das FNR-Promotorfragment FNR (SEQ ID No. 138) beinhaltet, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

15

- 100 ng genomischer DNA aus *A.thaliana*
- 0.25 mM dNTPs
- 20 - 0.2 mM FNR-1 (SEQ ID No. 136)
- 0.2 mM FNR-2 (SEQ ID No. 137)
- 5 µl? 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl? Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl? Aq. Dest.

25

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
30	50°C	1 Minute
	72°C	1 Minute
1X	72°C	10 Minuten

Das 652 bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pFNR erhalten.

35

Sequenzierung des Klons pFNR bestätigte eine Sequenz, die mit einem Sequenzabschnitt auf Chromosom 5 von *Arabidopsis thaliana* (Datenbankeintrag AB011474) von Position 70127 bis 69493 übereinstimmt.

40

Dieser Klon heisst pFNR und wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJONP196 (in Beispiel 19 beschrieben) verwendet.

45



## 162

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 644 bp SmaI-HindIII Fragmentes aus pFNR und Ligierung in den Ecl136II-HindIII geschnittenen Vektor pJONP196. Der Klon, der den Promoter FNR anstelle des ursprünglichen Promoters d35S und das Fragment NP196 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJOFNR:NP196.

Die Herstellung einer Expressionskassette für die Agrobacterium vermittelte Transformation der NP196-Ketolase aus *Nostoc* in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO02/00900).

Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP105 wurde das 1.839 bp EcoRI-XhoI Fragment aus pJOFNR:NP196 mit dem EcoRI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 22, Konstruktkarte). In der Abbildung 22 beinhaltet Fragment *FNR Promotor* den FNR Promotor (635 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NP196 KETO CDS* (761 bp), kodierend für die *Nostoc punctiforme* NP196-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von der Octopin- Synthase.

Die Herstellung einer Expressionskassette für die Agrobacterium- vermittelte Transformation des Expressionsvektor mit der NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

Zur Herstellung des *Tagetes*-Expressionsvektors MSP106 wurde das 1.839 bp EcoRI-XhoI Fragment aus pJOFNR:NP196 mit dem EcoRI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 23, Konstruktkarte). In der Abbildung 23 beinhaltet Fragment *FNR Promotor* den FNR Promotor (635 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NP196 KETO CDS* (761 bp), kodierend für die *Nostoc punctiforme* NP196-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von Octopin- Synthase.

Beispiel 21:

Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*

Die Expression der NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* in *L. esculentum* und *Tagetes erecta* erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715). Die Expression erfolgte unter Kontrolle des blütenspezifischen Promoters EPSPS aus *Petunia hybrida* (Datenbankeintrag M37029:

## 163

Nukleotidregion 7-1787; Benfey et al. (1990) Plant Cell 2: 849-856).

Das DNA Fragment, das die EPSPS Promoterregion (SEQ ID No. 141) aus *Petunia hybrida* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethoden aus *Petunia hybrida* isoliert) sowie der Primer EPSPS-1 (SEQ ID No. 139) und EPSPS-2 (SEQ ID No. 140) hergestellt.

10 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das EPSPS-Promoterfragment (Datenbankeintrag M37029: Nukleotidregion 7-1787) beinhaltet, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

15

- 100 ng genomischer DNA aus *A.thaliana*
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM EPSPS-1 (SEQ ID No. 139)
- 0.2 mM EPSPS-2 (SEQ ID No. 140)

20

- 5 µl? 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl? Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl? Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

25

- |     |         |            |
|-----|---------|------------|
| 1X  | 94°C    | 2 Minuten  |
| 35X | 94°C    | 1 Minute   |
|     | 50°C    | 1 Minute   |
|     | 72°C    | 2 Minuten  |
| 30  | 1X 72°C | 10 Minuten |

Das 1773 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pEPSPS erhalten.

35

Sequenzierung des Klons pEPSPS bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich durch zwei Deletion (Basen ctaagtttcagga in Position 46-58 der Sequenz M37029; Basen aaaaatat in Position 1422-1429 der Sequenz M37029) und die Basenaustausche (T statt G in Position 1447 der Sequenz M37029; A statt C in Position 1525 der Sequenz M37029; A statt G in Position 1627 der Sequenz M37029) von der publizierten EPSPS-Sequenz (Datenbankeintrag M37029: Nukleotidregion 7-1787) unterscheidet. Die zwei Deletionen und die zwei Basenaustausche an den Positionen 1447 und 1627 der Sequenz M37029 wurden in einem unabhängigen Amplifikations-

## 164

experiment reproduziert und repräsentieren somit die tatsächliche Nukleotidsequenz in den verwendeten *Petunia hybrida* Pflanzen.

Der Klon pEPSPS wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJONP196 (in Beispiel 19 beschrieben) verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1763 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pEPSPS und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJONP196. Der Klon, der den Promoter EPSPS anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJOESP:NP196. Diese Expressionskassette enthält das Fragment NP196 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem *rbcS*-Transitpeptid.

- 15 Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der EPSPS-kontrollierten NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO02/00900).
- 20 Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP107 wurde das 2.961 KB bp SacI-XhoI Fragment aus pJOESP:NP196 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 24, Konstruktkarte). In der Abbildung 24 beinhaltet Fragment EPSPS den EPSPS Promoter (1761 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment NP196 KETO CDS (761 bp), kodierend für die *Nostoc punctiforme* NP196-Ketolase, Fragment OCS Terminator (192 bp) das Polyadenylierungssignal von Octopin-Synthase.

Die Herstellung einer Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der EPSPS-kontrollierten NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP108 wurde das 2.961 KB bp SacI-XhoI Fragment aus pJOESP:NP196 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 25, Konstruktkarte). In der Abbildung 25 beinhaltet Fragment EPSPS den EPSPS Promoter (1761 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment NP196 KETO CDS (761 bp), kodierend für die *Nostoc punctiforme* NP196-Ketolase, Fragment OCS Terminator (192 bp) das Polyadenylierungssignal von Octopin-Synthase.

## 165

Beispiel 22:

Amplifikation einer DNA, die die gesamte Primärsequenz der NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 kodiert

- 5 Die DNA, die für die NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 kodiert, wurde mittels PCR aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 (Stamm der "American Type Culture Collection") amplifiziert. Die Präparation von genomischer DNA aus einer Suspensionskultur von *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 wurde in Beispiel 10 19 beschrieben.

- Die Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133, wurde mittels "polymerase chain reaction" (PCR) aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 unter Verwendung eines sense-spezifischen Primers (NP195-1, SEQ ID No. 142) und eines antisense-spezifischen Primers (NP195-2 SEQ ID No. 143) amplifiziert. 15

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

- 20 Die PCR zur Amplifikation der DNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:
- 1 µl einer *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 DNA (hergestellt wie 25 oben beschrieben)
  - 0.25 mM dNTPs
  - 0.2 mM NP195-1 (SEQ ID No. 142)
  - 0.2 mM NP195-2 (SEQ ID No. 143)
  - 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
  - 30 - 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
  - 25.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- |    |     |      |            |
|----|-----|------|------------|
| 35 | 1X  | 94°C | 2 Minuten  |
|    | 35X | 94°C | 1 Minute   |
|    |     | 55°C | 1 Minuten  |
|    |     | 72°C | 3 Minuten  |
|    | 1X  | 72°C | 10 Minuten |

40

- Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 142 und SEQ ID No. 143 resultierte in einem 819 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert (NP195, SEQ ID No. 144). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den 45 PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und der Klon pNP195 erhalten.

## 166

Sequenzierung des Klons pNP195 mit dem M13F- und dem M13R-Primer bestätigte eine Sequenz, welche mit der DNA-Sequenz von 55,604-56,392 des Datenbank-eintrages NZ\_AABC010001965 identisch ist, mit der Ausnahme, daß T in Position 55.604 durch A ersetzt wurde, um ein Standard-Startkodon ATG zu erzeugen. Diese Nukleotidsequenz wurde in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Nostoc punctiforme* ATCC 29133.

- 10 Dieser Klon pNP195 wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJ0 (in Beispiel 19 beschrieben) verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 809 Bp SphI-Fragmentes aus pNP195 und Ligierung in den SphI geschnittenen Vektor pJ0. Der Klon, der die NP195-Ketolase von *Nostoc punctiforme* in der
- 15 korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJONP195.

Beispiel 23:

- Herstellung von Expressionsvektoren zur konstitutiven Expression
- 20 der NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.

- Die Expression der NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* in *L. esculentum* und in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle des
- 25 konstitutiven Promoters FNR (Ferredoxin-NADPH-Oxidoreductase, Datenbankeintrag AB011474 Position 70127 bis 69493; WO03/006660), aus *Arabidopsis thaliana*. Das FNR-Gen beginnt bei Basenpaar 69492 und ist mit "Ferredoxin-NADP+ Reductase" annotiert. Die Expression erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson
- 30 et al. 1986, Biochem J. 240:709-715).

Der Klon pFNR (in Beispiel 20 beschrieben) wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJONP195 (in Beispiel 22 beschrieben) verwendet.

35

- Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 644 bp Sma-HindIII Fragmentes aus pFNR und Ligierung in den Ecl136II-HindIII geschnittenen Vektor pJONP195. Der Klon, der den Promoter FNR anstelle des ursprünglichen Promoters d35S und das Fragment
- 40 NP195 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJOFNR:NP195.

- Die Herstellung einer Expressionskassette für die Agrobacterium vermittelte Transformation der NP195-Ketolase aus *Nostoc puncti-*
- 45 *forme* in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO02/00900).

## 167

Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP109 wurde das 1.866 bp EcoRI-XhoI Fragment aus pJOFNR:NP195 mit dem EcoRI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 26, Konstruktkarte). In der Abbildung 26 beinhaltet Fragment *FNR Promotor* den FNR Promotor (635 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NP195 KETO CDS* (789 bp), kodierend für die *Nostoc punctiforme* NP195-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von der Octopin- Synthase.

- 10 Die Herstellung einer Expressionskassette für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation des Expressionsvektor mit der NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* *punctiforme* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO 02/00900).

15

Zur Herstellung des *Tagetes*-Expressionsvektors MSP110 wurde das 1.866 bp EcoRI-XhoI Fragment aus pJOFNR:NP195 mit dem EcoRI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 27, Konstruktkarte). In der Abbildung 27 beinhaltet Fragment *FNR Promotor* den FNR Promotor (635 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NP195 KETO CDS* (789 bp), kodierend für die *Nostoc punctiforme* NP195-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von Octopin-Synthase.

25

Beispiel 24:

Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.

30

Die Expression der NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* in *L. esculentum* und *Tagetes erecta* erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715). Die Expression erfolgte unter Kontrolle des blütenspezifischen Promoters EPSPS aus *Petunia hybrida* (Datenbankeintrag M37029: Nukleotidregion 7-1787; Benfey et al. (1990) Plant Cell 2: 849-856).

- 40 Der Klon pEPSPS (in Beispiel 21 beschrieben) wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJONP195 (in Beispiel 22 beschrieben) verwendet.

- 45 Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1763 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pEPSPS und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJONP195. Der Klon, der den Promoter EPSPS anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJOESP:NP195. Diese Expressionskassette enthält das Fragment

## 168

NP195 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem *rbcS*-Transitpeptid.

Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacterium-  
5 vermittelte Transformation der EPSPS-kontrollierten NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO02/00900).

Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP111 wurde das 2.988 KB  
10 bp SacI-XhoI Fragment aus pJOESP:NP195 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 28, Konstruktkarte). In der Abbildung 28 beinhaltet Fragment EPSPS den EPSPS Promoter (1761 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment NP195 KETO CDS (789 bp), kodierend für  
15 die *Nostoc punctiforme* NP195-Ketolase, Fragment OCS Terminator (192 bp) das Polyadenylierungssignal von Octopin-Synthase.

Die Herstellung einer Expressionsvektors für die Agrobacterium-  
vermittelte Transformation der EPSPS-kontrollierten NP195-Keto-  
20 lase aus *Nostoc punctiforme* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP112 wurde das 2.988 KB  
bp SacI-XhoI Fragment aus pJOESP:NP195 mit dem SacI-XhoI ge-  
25 schnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 29, Konstruktkarte). In der Abbildung 29 beinhaltet Fragment EPSPS den EPSPS Promoter (1761 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment NP195 KETO CDS (789 bp), kodierend für die *Nostoc punctiforme* NP195-Ketolase, Fragment OCS Terminator  
30 (192 bp) das Polyadenylierungssignal von Octopin-Synthase.

## Beispiel 25:

Amplifikation einer DNA, die die gesamte Primärsequenz der NODK-Ketolase aus *Nodularia spumigena* NSOR10 kodiert.

35

Die DNA, die für die Ketolase aus *Nodularia spumigena* NSOR10 kodiert, wurde mittels PCR aus *Nodularia spumigena* NSOR10 amplifiziert.

40 Für die Präparation von genomischer DNA aus einer Suspensionskultur von *Nodularia spumigena* NSOR10, die 1 Woche mit Dauerlicht und konstantem Schütteln (150 rpm) at 25°C in BG 11-Medium (1,5 g/l NaNO<sub>3</sub>, 0,04 g/l K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, 0,075 g/l MgSO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O, 0,036 g/l CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,006 g/l citric acid, 0,006 g/l Ferric ammonium citrate, 0,001 g/l EDTA disodium magnesium, 0,04 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1 ml  
45 Trace Metal Mix "A5+Co" (2,86 g/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1,81 g/l MnCl<sub>2</sub>·xH<sub>2</sub>O, 0,222 g/l ZnSO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O, 0,39 g/l NaMoO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O, 0,079 g/l CuSO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O,

## 169

0,0494 g/l  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  gewachsen war, wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert.

5 Protokoll für die DNA-Isolation aus *Nodularia spumignea* NSOR10:

Aus einer 10 ml Flüssigkultur wurden die Bakterienzellen durch 10minütige Zentrifugation bei 8000 rpm pelletiert. Anschließend wurden die Bakterienzellen in flüssigem Stickstoff mit einem  
10 Mörser zerstoßen und gemahlen. Das Zellmaterial wurde in 1 ml 10 mM Tris\_HCl (pH 7,5) resuspendiert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (2 ml Volumen) überführt. Nach Zugabe von 100 µl Proteinase K (Konzentration: 20 mg/ml) wurde die Zellsuspension für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde  
15 die Suspension mit 500 µl Phenol extrahiert. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 13 000 upm wurde die obere, wässrige Phase in ein neues 2-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion mit Phenol wurde 3mal wiederholt. Die DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 0,6 Volumen Iso-  
20 propanol gefällt und anschließend mit 70 % Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet, in 25 µl Wasser aufgenommen und unter Erhitzung auf 65°C gelöst.

Die Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase aus *Nodularia spumignea*  
25 NSOR10, wurde mittels "polymerase chain reaction" (PCR) aus *Nodularia spumignea* NSOR10 unter Verwendung eines sense-spezifischen Primers (NODK-1, SEQ ID No. 146) und eines antisense-spezifischen Primers (NODK-2 SEQ ID No. 147) amplifiziert.

## 30 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

35

- 1 µl einer *Nodularia spumignea* NSOR10 DNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM NODK-1 (SEQ ID No. 146)
- 40 - 0.2 mM NODK-2 (SEQ ID No. 147)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 µl Aq. Dest.

45



## 170

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
5	55°C	1 Minuten
	72°C	3 Minuten
1X	72°C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 146 und SEQ ID No. 147 resultierte in einem 720 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert (NODK, SEQ ID No. 148). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und der Klon pNODK erhalten.

15

Sequenzierung des Klons pNODK mit dem M13F- und dem M13R-Primer bestätigte eine Sequenz, welche mit der DNA-Sequenz von 2130-2819 des Datenbank-eintrages AY210783 identisch ist (inverse orientiert zum veröffentlichen Datenbankeintrag). Diese Nukleotidsequenz wurde in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Nodularia spumignea* NSOR10.

20

Dieser Klon pNODK wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJ0 (in Beispiel 19 beschrieben) verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 710 Bp SphI-Fragmentes aus pNODK und Ligierung in den SphI geschnittenen Vektor pJ0. Der Klon, der die NODK-Ketolase von *Nodularia spumignea* in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJONODK.

30

Beispiel 26:

Herstellung von Expressionsvektoren zur konstitutiven Expression der NODK-Ketolase aus *Nodularia spumignea* NSOR10 in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.

35

Die Expression der NODK-Ketolase aus *Nodularia spumignea* NSOR10 in *L. esculentum* und in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle des konstitutiven Promoters FNR (Ferredoxin-NADPH-Oxidoreductase, Datenbankeintrag AB011474 Position 70127 bis 69493; WO03/006660), aus *Arabidopsis thaliana*. Das FNR-Gen beginnt bei Basenpaar 69492 und ist mit "Ferredoxin-NADP+ Reductase" annotiert. Die Expression erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715).

40

45

## 171

Der Klon pFNR (in Beispiel 20 beschrieben) wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJONODK (in Beispiel 25 beschrieben) verwendet.

- 5 Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 644 bp Sma-HindIII Fragmentes aus pFNR und Ligierung in den Ecl136II-HindIII geschnittenen Vektor pJONODK. Der Klon, der den Promoter FNR anstelle des ursprünglichen Promoters d35S und das Fragment NODK in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS  
10 Transitpeptid enthält, heisst pJOFNR:NODK.

- Die Herstellung einer Expressionskassette für die Agrobacterium vermittelte Transformation der NODK-Ketolase aus *Nodularia spumigena NSOR10* in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung  
15 des binären Vektors pSUN3 (WO02/00900).

- Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP113 wurde das 1.767 bp EcoRI-XhoI Fragment aus pJOFNR:NODK mit dem EcoRI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 30, Konstruktkarte). In der  
20 Abbildung 30 beinhaltet Fragment *FNR Promotor* den FNR Promotor (635 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NODK KETO CDS* (690 bp), kodierend für die *Nodularia spumigena NSOR10* NODK-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von der Octopin-  
25 Synthase.

- Die Herstellung einer Expressionskassette für die Agrobacterium-vermittelte Transformation des Expressionsvektor mit der NODK-Ketolase aus *Nodularia spumigena NSOR10 punctiforme* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5  
30 (WO02/00900).

- Zur Herstellung des *Tagetes*-Expressionsvektors MSP114 wurde das 1.767 bp EcoRI-XhoI Fragment aus pJOFNR:NODK mit dem EcoRI-XhoI  
35 geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 31, Konstruktkarte). In der Abbildung 31 beinhaltet Fragment *FNR Promotor* den FNR Promotor (635 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NODK KETO CDS* (690 bp), kodierend für die *Nodularia spumigena NSOR10* NODK-Ketolase, Frag-  
40 ment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von Octopin-Synthase.

## 172

Beispiel 27:

Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der NODK-Ketolase aus *Nodularia spumignea* NSOR10 in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.

5

Die Expression der NODK-Ketolase aus *Nodularia spumignea* NSOR10 in *L. esculentum* und *Tagetes erecta* erfolgte mit dem Transit-peptid *rbcS* aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J.

240:709-715). Die Expression erfolgte unter Kontrolle des blüten-  
10 spezifischen Promoters EPSPS aus *Petunia hybrida* (Datenbankeintrag M37029: Nukleotidregion 7-1787; Benfey et al. (1990) Plant Cell 2: 849-856).

Der Klon pEPSPS (in Beispiel 21 beschrieben) wurde daher für  
15 die Klonierung in den Expressionsvektor pJONODK (in Beispiel 25 beschrieben) verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1763 Bp SacI-HindIII  
Fragmentes aus pEPSPS und Ligierung in den SacI-HindIII geschnit-  
20 tenen Vektor pJONODK. Der Klon, der den Promoter EPSPS anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJOESP:NODK. Diese Expressionskassette enthält das Fragment NODK in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem *rbcS*-Transitpeptid.

25

Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der EPSPS-kontrollierten NODK-Ketolase aus *Nodularia spumignea* NSOR10 in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO02/00900).

30

Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP115 wurde das 2.889 KB bp SacI-XhoI Fragment aus pJOESP:NODK mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 32, Konstruktkarte). In der  
Abbildung 32 beinhaltet Fragment EPSPS den EPSPS Promoter (1761  
35 bp), Fragment *rbcS* TP FRAGMENT das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment NODK KETO CDS (690 bp), kodierend für die *Nodularia spumignea* NSOR10 NODK-Ketolase, Fragment OCS Terminator (192 bp) das Polyadenylierungssignal von Octopin-Synthase.

40 Die Herstellung einer Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der EPSPS-kontrollierten NODK-Ketolase aus *Nodularia spumignea* NSOR10 in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

45 Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP116 wurde das 2.889 KB bp SacI-XhoI Fragment aus pJOESP:NODK mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 33, Konstruktkarte). In

## 173

der Abbildung 33 beinhaltet Fragment EPSPS den EPSPS Promoter (1761 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NODK KETO CDS* (690 bp), kodierend für die *Nodularia spumignea NSOR10* NODK-Ketolase, Fragment *OCS Termini-5 nator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von Octopin-Synthase.

Beispiel 28:

Herstellung transgener *Lycopersicon esculentum* Pflanzen

- 10 Transformation und Regeneration von Tomatenpflanzen wurde wie in Beispiel 6 beschrieben durchgeführt.

Gemäß der in Beispiel 6 beschriebenen Transformationsmethode wurden mit folgenden Expressionskonstrukten folgende Linien

- 15 erhalten:

Mit MSP105 wurde erhalten: msp105-1, msp105-2, msp105-3

Mit MSP107 wurde erhalten: msp107-1, msp107-2, msp107-3

- 20 Mit MSP109 wurde erhalten: msp109-1, msp109-2, msp109-3

Mit MSP111 wurde erhalten: msp111-1, msp111-2, msp111-3

Mit MSP113 wurde erhalten: msp113-1, msp113-2, msp113-3

Mit MSP115 wurde erhalten: msp115-1, msp115-2, msp115-3

- 25

Die Charakterisierung und Analyse der transgenen *Lycopersicon esculentum* Pflanzen erfolgt wie in Beispiel 6 beschrieben.

Beispiel 29:

- 30 Herstellung transgener *Tagetes* Pflanzen

Die Transformation und Regeneration von *Tagetes* Pflanzen wurde wie in Beispiel 7 beschrieben durchgeführt.

- 35 Gemäß der in Beispiel 7 beschriebenen Transformationsmethode wurden mit folgenden Expressionskonstrukten folgende Linien erhalten:

Mit MSP106 wurde erhalten: msp106-1, msp106-2, msp106-3

- 40

Mit MSP108 wurde erhalten: msp108-1, msp108-2, msp108-3

Mit MSP110 wurde erhalten: msp110-1, msp110-2, msp110-3

Mit MSP112 wurde erhalten: msp112-1, msp112-2, msp112-3

- 45 Mit MSP114 wurde erhalten: msp114-1, msp114-2, msp114-3

Mit MSP116 wurde erhalten: msp116-1, msp116-2, msp116-3

## 174

Die Charakterisierung der transgenen *Tagetes* Pflanzen erfolgt wie unter Beispiel 8 und 9 sowie wie in Beispiel 17 beschrieben.

Beispiel 30:

- 5 Herstellung eines Doppel-Expressionsvektors zur Runterregulierung der Epsilon-Cyclase Transkriptmengen sowie der Expression der *Nostoc punctiforme* Ketolase NP196-1 blütenspezifisch in *Tagetes erecta*.
- 10 Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 2963 Bp Ecl136II-XhoI Fragmentes aus MSP107 (siehe Beispiel 21) und Ligierung mit dem XhoI-SmaI geschnittenen Vektor pS5AI7 (Beispiel 14). Durch die Ligation entsteht eine T-DNA die zwei Expressionskassetten enthaelt: erstens die Inverted-Repeat-Cassette gerichtet gegen
- 15 die Ecyclase aus *Tagetes erecta* und zweitens eine Kassette zur Überexpression der Ketolase NP196-1 aus *Nostoc punctiforme*. Dieser Klon, heisst pCSP01 (Abbildung 34, Konstruktkarte). In der Abbildung 34 beinhaltet Fragment AP3P (776 bp) den AP3P-Promoter, Fragment *ecycS* (439 bp) die 5'Region der *Tagetes Ecyclase* Sequenz
- 20 aus pJIT117, Fragment *intron* ( 207 bp) das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment *ecycAS* (440 bp) die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* in Antisense-Orientierung, Fragment 35T (763 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV. Weiterhin beinhaltet Fragment *ocs* (191 bp) das Polyadenylierungs-
- 25 signal des Octopin-Synthasegens, Fragment NP196 (762 bp) die Ketolase aus *Nostoc punctiforme*, Fragment TP (183 bp) das Trans- itpeptid des *rbcS* Gens aus Erbse, Fragment EPSPS (1761 bp) den EPSPS Promoter.
- 30 Beispiel 31:  
Herstellung einer Expressionskassette zur blütenspezifischen Überexpression der chromoplastenspezifischen B-Hydroxylase aus *Lycopersicon esculentum*.
- 35 Die Expression der chromoplastenspezifischen B-Hydroxylase aus *Lycopersicon esculentum* in *Tagetes erecta* erfolgt unter Kontrolle des blütenspezifischen Promoters EPSPS aus Petunie (Beispiel 21). Als Terminatorelement wird LB3 aus *Vicia faba* verwendet. Die Sequenz der chromoplastenspezifischen B-Hydroxylase wurde durch
- 40 RNA Isolierung, reverse Transkription und PCR hergestellt.

Für die Herstellung der LB3-Terminator-Sequenz aus *Vicia faba* wird genomische DNA aus *Vicia faba*-Gewebe nach Standardmethoden isoliert und durch genomische PCR unter Verwendung der Primer

- 45 PR206 und PR207 eingesetzt. Die PCR zur Amplifikation dieses LB3

## 175

DNA-Fragmentes, erfolgt in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten ist:

- 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 5 - 0.25 mM dNTPs
- 0.2 µM PR206 (SEQ ID No. 150)
- 0.2 µM PR207 (SEQ ID No. 151)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 10 - 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR-Amplifikation mit PR206 und PR207 resultiert in einem 0.3 kb Fragment das für den LB-Terminator enthaelt. Das Amplifikat wird in den Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert.

- 15 Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigen eine zur Sequenz SEQ ID: 160 identische Sequenz. Dieser Klon heisst pTA-LB3 und wird daher für die Klonierung in den Vektor pJIT117 verwendet (siehe unten).
- 20 Für die Herstellung der b-Hydroxylase-Sequenz wird Total-RNA aus Tomate präpariert. Dazu werden 100 mg der gefrorenen, pulverisierten Blüten in ein Reaktionsgefäß überführt und in 0,8 ml Trizol-Puffer (LifeTechnologies) aufgenommen. Die Suspension wird mit 0,2 ml Chloroform extrahiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12000 g wird der wässrige Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Ethanol extrahiert. Die RNA wird mit einem Volumen Isopropanol gefällt, mit 75 % Ethanol gewaschen und das Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser mit 1/1000 Volumen Diethylpyrocarbonat bei Raumtemperatur, anschließend autoklaviert) gelöst.
- 30 Die RNA-Konzentration wird photometrisch bestimmt. Für die cDNA-Synthese werden 2,5 µg Gesamt-RNA für 10 min bei 60°C denaturiert, für 2 min auf Eis abgekühlt und mittels eines cDNA-Kits (Ready-to-go-you-prime-beads, Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben unter Verwendung eines antisense spezifischen Primers (PR215 SEQ ID No. 152) in cDNA umgeschrieben.
- 35

Die Bedingungen der anschließenden PCR-Reaktionen sind die folgenden:

40

Die PCR zur Amplifikation des VPR203-PR215 DNA-Fragmentes, das fuer die B-Hydroxylase kodiert, erfolgt in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 45 - 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 µM VPR203 (SEQ ID No. 159)

## 176

- 0.2 uM PR215 (SEQ ID No. 152)
- 5 ul 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ul R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ul Aq. Dest.

5

Die PCR-Amplifikation mit VPR203 und PR215 resultiert in einem 0.9 kb Fragment das für die b-Hydroxylase kodiert. Das Amplifikat wird in den Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigen eine zur

10 Sequenz SEQ ID No. 161 identische Sequenz. Dieser Klon heisst pTA-CrtR-b2 und wird daher für die Klonierung in den Vektor pCSP02 verwendet (siehe unten).

Die EPSPS-Promoter-Sequenz aus Petunie wird durch PCR Ampli-

15 fikation unter Verwendung des Plasmides MSP107 (s. Beispiel 21) und der Primer VPR001 und VPR002 hergestellt. Die PCR zur Amplifikation dieses EPSPS-DNA-Fragmentes, erfolgt in einem 50 ul Reaktionsansatz, in dem enthalten ist:

- 20 - 1 ul cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
  - 0.2 uM VPR001 (SEQ ID No. 157)
  - 0.2 uM VPR002 (SEQ ID No. 158)
  - 5 ul 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 25 - 0.25 ul R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ul Aq. Dest.

Die PCR-Amplifikation mit VPR001 und VPR002 resultiert in einem 1.8 kb Fragment das den EPSPS-Promoter kodiert. Das Amplifikat

30 wird in den Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigen eine zur Sequenz SEQ ID: 162 identische Sequenz. Dieser Klon heisst pTA-EPSPS und wird daher für die Klonierung in den Vektor pCSP03 verwendet (siehe unten).

35

Der erste Klonierungsschritt erfolgt durch Isolierung des 0,3 kb PR206-PR207 EcoRI-XhoI Fragmentes aus pTA-LB3, abgeleitet vom Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen), und Ligierung mit dem EcoRI-XhoI geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den 0,3 kb

40 Terminator LB3 enthält, heisst pCSP02.

Der zweite Klonierungsschritt erfolgt durch Isolierung des 0,9 kb VPR003-PR215 EcoRI-HindIII Fragmentes aus pTA-CrtR-b2, abgeleitet vom Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen), und Ligierung mit

45 dem EcoRI-HindIII geschnittenen Vektor pCSP02. Der Klon, der das 0,9 kb B-Hydroxylase-Fragment CrtR-b2 enthält, heisst pCSP03.

## 177

Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem Terminator LB3 und dem B-Hydroxylase-Fragment CrtR-b2.

Der dritte Klonierungsschritt erfolgt durch Isolierung des 1,8 kb  
 5 VPR001-VPR002 NcoI-SacI Fragmentes aus pTA-EPSPS, abgeleitet vom Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen), und Ligierung mit dem NcoI-SacI geschnittenen Vektor pCSP03. Der Klon, der das 1,8 kb EPSPS Promoter-Fragment enthält, heisst pCSP04. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem EPSPS-  
 10 Promoter und dem  $\beta$ -Hydroxylase-Fragment CrtR-b2. (Abbildung 35, Konstruktkarte). In der Abbildung 35 beinhaltet Fragment Fragment EPSPS (1792 bp) den EPSPS Promoter, das Fragment *crtRb2* (929 bp) die B-Hydroxylase CrtRb2, Fragment LB3 (301 bp) den LB3 Terminator.

15

Zur Klonierung dieser  $\beta$ -Hydroxylase-Überexpressionskassette in Expressionsvektoren für die Agrobacterium-vermittelte Transformation von *Tagetes erecta* wird die  $\beta$ -Hydroxylase-Kassette als 3103 bp Ecl136II-XhoI Fragmentes isoliert. Das Auffüllen der 3'Enden  
 20 (30 min bei 30°C) erfolgt nach Standardmethoden (Klenow-fill-in).

## Beispiel 32:

Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die blü- tenspezifische Expression von b-Hydroxylase dsRNA in *Tagetes*  
 25 *erecta* (gerichtet gegen die 5'Region der b-Hydroxylase cDNA)

Die Nukleinsäure, die die 5'terminale bp Region der b-Hydroxylase cDNA (Genbank accession no. AF251018) enthält, wird mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Tagetes erecta* cDNA unter  
 30 Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR217 SEQ ID No. 153) und eines antisense spezifischen Primers (PR218 SEQ ID No. 154) amplifiziert.

Für die Präparation von Total-RNA aus Blüten von *Tagetes* werden  
 35 100 mg der gefrorenen, pulverisierten Blüten in ein Reaktionsgefäß überführt und in 0,8 ml Trizol-Puffer (LifeTechnologies) aufgenommen. Die Suspension wird mit 0,2 ml Chloroform extrahiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12 000 g wurde der wässrige Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß  
 40 überführt und mit einem Volumen Ethanol extrahiert. Die RNA wird mit einem Volumen Isopropanol gefällt, mit 75 % Ethanol gewaschen und das Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser mit 1/1000 Volumen Diethylpyrocarbonat bei Raumtemperatur, anschließend autoklaviert) gelöst. Die RNA-Konzentration wird  
 45 photometrisch bestimmt. Für die cDNA-Synthese werden 2,5 ug Gesamt-RNA für 10 min bei 60°C denaturiert, für 2 min auf Eis abgekühlt und mittels eines cDNA-Kits (Ready-to-go-you-prime-



## 178

beads, Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben unter Verwendung eines antisense spezifischen Primers (PR218 SEQ ID No. 154) in cDNA umgeschrieben.

- 5 Die Bedingungen der anschließenden PCR-Reaktionen sind die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR217-PR218 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 0.3 kb Region der b-Hydroxylase enthält, erfolgt in  
10 einem 50 ul? Reaktionsansatz, in dem enthalten ist:

- 1 ul? cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 uM PR217 (SEQ ID No. 153)
- 15 - 0.2 uM PR218 (SEQ ID No. 154)
- 5 ul? 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ul? R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ul? Aq. Dest.

20 Die PCR zur Amplifikation des PR220-PR219 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 0,3kb Region der b-Hydroxylase enthält, erfolgt in einem 50 ul Reaktionsansatz, in dem enthalten ist:

- 1 ul cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 25 - 0.25 mM dNTPs
- 0.2 uM PR220 (SEQ ID No. 156)
- 0.2 uM PR219 (SEQ ID No. 155)
- 5 ul 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ul R Taq Polymerase (TAKARA)
- 30 - 28.8 ul Aq. Dest.

Die PCR-Reaktionen werden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- |    |     |      |            |
|----|-----|------|------------|
| 35 | 1X  | 94°C | 2 Minuten  |
|    | 35X | 94°C | 1 Minute   |
|    |     | 58°C | 1 Minuten  |
|    |     | 72°C | 1 Minuten  |
|    | 1X  | 72°C | 10 Minuten |

40

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR217 und PR218 resultiert in einem 332 Bp-Fragment (SEQ ID NO: 163), die PCR-Amplifikation mit Primer PR219 und PR220 resultiert in einem 332 Bp-Fragment (SEQ ID NO: 164).

45

## 179

Die beiden Amplifikate, das PR217-PR218 (HindIII-SalI sense) Fragment und das PR220-PR219 (EcoRI-BamHI antisense) Fragment, werden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Die resultierenden  
5 Klone heißen pCR-BluntII-bhydrS (PR217-PR218-Fragment) bzw. pCR-BluntII-bhydrAS (PR220-PR219-Fragment). Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigen jeweils eine zur publizierte Sequenz AF251018 (SEQ ID No. 165) identische Sequenz abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen. Diese Klone werden daher für  
10 die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel 10) verwendet.

Der erste Klonierungsschritt erfolgt durch Isolierung des 332 Bp PR217-PR218 HindIII-SalI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor  
15 pCR-BluntII-bhydrS (Invitrogen) und Ligierung mit dem HindIII-SalI geschnittenen Vektor pJAI1. Der Klon, der die 5'terminale Region der P-Hydroxylase in der sense Orientierung enthält, heißt pCSP05. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem AP3P und dem sense Fragment der 5'terminale  
20 Region der  $\beta$ -Hydroxylase sowie dem Intron andererseits.

Der zweite Klonierungsschritt erfolgt durch Isolierung des 332 Bp PR220-PR219 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII-bhydrAS (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI  
25 geschnittenen Vektor pCSP05. Der Klon, der die 332 bp 5'terminale Region der  $\beta$ -Hydroxylase cDNA in der antisense Orientierung enthält, heißt pCSP06. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem antisense Fragment der 5'terminale Region der  $\beta$ -Hydroxylase und dem Polyadenylierungssignal aus CaMV  
30 einerseits und dem Intron andererseits.

Zur Klonierung dieser Runterregulierungskassette in Expressionsvektoren für die Agrobacterium-vermittelte Transformation von *Tagetes erecta* wird die Inverted-Repeat-Kassette als 2394 bp  
35 Ecl136II-XhoI Fragmentes isoliert. Das Auffüllen der 3'Enden (30 min bei 30°C) erfolgt nach Standardmethoden (Klenow-fill-in).

In der Abbildung 36 beinhaltet Fragment AP3P (767 bp) den AP3P-Promoter, Fragment 5'bhydrS (291 bp) die 5'Region der  $\beta$ -Hydroxylase aus *Tagetes erecta* in Sense-Orientierung, Fragment intron (206 bp) das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment 5'bhydrS (326 bp) die 5'Region der  $\beta$ -Hydroxylase aus *Tagetes erecta* in Antisense-Orientierung, und Fragment 35T (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.  
45

## 180

Zur Klonierung dieser Runterregulierungskassette in Expressionsvektoren für die Agrobacterium-vermittelte Transformation von *Tagetes erecta* wird die Inverted-Repeat-Kassette als 2392 bp Ecl136II-XhoI Fragmentes isoliert. Das Auffüllen der 3'Enden  
 5 (30 min bei 30°C) erfolgt nach Standardmethoden (Klenow-fill-in).

## Beispiel 33:

Herstellung eines Dreifach-Expressionsvektors zur Runterregulierung der Epsilon-Cyclase, der Expression der *Nostoc punctiforme*  
 10 Ketolase NP196-1, sowie der Überexpression der chromoplastenspezifischen B-Hydroxylase aus *Lycopersicon esculentum* blütenspezifisch in *Tagetes erecta*.

Die Klonierung dieses Dreifach-Expressionsvektors erfolgt durch  
 15 Isolierung des 3103 Bp Ecl136II-XhoI Fragmentes aus pCSP04 (siehe Beispiel 31), nachfolgendes Klenow-Auffuellen des 5'Überhangs der XhoI Schnittstelle (nach Standardmethoden durchgeführt) und schliesslich Ligierung in dem Ecl136II-geschnittenen Vektor pCSP01 (Beispiel 30). Durch die Ligation entsteht eine T-DNA die  
 20 drei Expressionskassetten enthaelt: erstens die Inverted-Repeat-Cassette gerichtet gegen die Ecyclase aus *Tagetes erecta*, zweitens eine Kassette zur Überexpression der Ketolase NP196-1 aus *Nostoc punctiforme*, und drittens eine Kassette zur chromoplastenspezifischen Überexpression der B-Hydroxylase aus *Lycopersicon*  
 25 *esculentum*. Die  $\beta$ -Hydroxylase-Überexpressions-kassette kann in zwei Orientierungen in den Vektor ligieren. Das hier beschriebene Beispiel pCSP07 beinhaltet beide resultierenden Versionen pCSP07F und pCSP07R des Dreifach-Expressionsvektors.

30 Stellvertretend ist hier die Konstruktkarte fuer Version pCSP07F des Beispiels pCSP07 angeben (Abbildung 37, Konstruktkarte).

In der Abbildung 37 beinhaltet Fragment AP3P (773 bp) den AP3P-Promoter, Fragment ecycS (439 bp) die 5'Region der Ecyclase  
 35 Sequenz aus *Tagetes erecta* in Sense-Orientierung, Fragment intron (207 bp) das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment ecycAS (440 bp) die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* in Antisense-Orientierung, Fragment 35T (763 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.  
 40

Weiterhin beinhaltet Fragment ocs (191 bp) das Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthasegens, Fragment NP196 (762 bp) die Ketolase aus *Nostoc punctiforme*, Fragment TP (183 bp) das Trans-  
 45 itpeptid des rbcS Gens aus Erbse, Fragment EPSPS (1761 bp) den EPSPS Promoter.

## 181

Weiterhin beinhaltet Fragment *EPSPS* (1792 bp) den *EPSPS* Promoter, das Fragment *crtRb2* (929 bp) die B-Hydroxylase *CrtRb2*, Fragment *LB3* (301 bp) den *LB3* Terminator.

- 5 Transformation und Regeneration von Tagetespflanzen wurde in Beispiel 7 beschrieben.

Beispiel 34:

- Herstellung eines Vierfach-Expressionsvektors zur Runterregulie-  
 10 rung der Epsilon-Cyclase, der Expression der *Nostoc punctiforme* Ketolase NP196-1, der Überexpression der chromoplastenspezifischen B-Hydroxylase aus *Lycopersicon esculentum* sowie der Runterregulierung der B-Hydroxylase aus *Tagetes erecta* blütenspezifisch in *Tagetes erecta*.

15

- Die Klonierung dieses Vierfach-Expressionsvektors erfolgt durch Isolierung des 2392 Bp *Ecl136II-XhoI* Fragmentes aus pCSP06 (siehe Beispiel 32), nachfolgendes Klenow-Auffuellen des 5'Überhangs der *XhoI*-Schnittstelle (nach Standardmethoden durchgeführt)  
 20 und schliesslich Ligierung in dem *Ecl136II*-geschnittenen Vektor pCSP07 (Beispiel 33). Durch die Ligation entsteht eine T-DNA die vier Expressionskassetten enthaelt: erstens die Inverted-Repeat-Cassette gerichtet gegen die *Ecyclase* aus *Tagetes erecta*, zweitens eine Kassette zur Überexpression der Ketolase NP196-1 aus  
 25 *Nostoc punctiforme*, drittens eine Kassette zur chromoplastenspezifischen Überexpression der B-Hydroxylase aus *Lycopersicon esculentum*, und viertens eine Inverted-Repeat-Kassette gerichtet gegen die B-Hydroxylase aus *Tagetes erecta*. Die B-Hydroxylase-Runterregulierungs-Kassette kann in zwei Orientierungen in den  
 30 Vektor ligieren. Das hier beschriebene Beispiel pCSP08 beinhaltet beide resultierenden Versionen pCSP08F und pCSP08R des Vierfach-Expressionsvektors.

- Stellvertretend ist hier die Konstruktkarte fuer Version pCSP08F  
 35 des Beispiels pCSP08 angeben (Abbildung 38, Konstruktkarte). In der Abbildung 38 beinhaltet Fragment *AP3P* (773 bp) den *AP3P*-Promoter, Fragment *ecycS* (439 bp) die 5'Region der *Ecyclase* Sequenz aus *Tagetes erecta* in Sense-Orientierung, Fragment *intron* (207 bp) das Intron *PIV2* des Kartoffel-Gens *ST-LS1*, Fragment  
 40 *ecycAS* (440 bp) die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* in Antisense-Orientierung, Fragment *35T* (763 bp) das Polyadenylierungssignal von *CaMV*.

- Weiterhin beinhaltet Fragment *ocs* (191 bp) das Polyadenylierungs-  
 45 signal des Octopin-Synthasegens, Fragment *NP196* (762 bp) die Ketolase aus *Nostoc punctiforme*, Fragment *TP* (183 bp) das

## 182

Transitpeptid des *rbcS* Gens aus Erbse, Fragment *EPSPS* (1761 bp) den EPSPS Promoter.

Weiterhin beinhaltet Fragment *EPSPS* (1792 bp) den EPSPS Promoter, 5 das Fragment *crtRb2* (929 bp) die B-Hydroxylase *CrtRb2*, Fragment *LB3* (301 bp) den LB3 Terminator.

Weiterhin beinhaltet Fragment *AP3P* (767 bp) den AP3P-Promoter, Fragment *5'bhydrS* (291 bp) die 5'-Region der B-Hydroxylase aus 10 *Tagetes erecta* in Sense-Orientierung, Fragment *intron* (206 bp) das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens *ST-LS1*, Fragment *5'bhydrS* (326 bp) die 5'-Region der B-Hydroxylase aus *Tagetes erecta* in Antisense-Orientierung, und Fragment *35T* (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

15

Beispiel 35:

- Herstellung eines Fuenffach-Expressionsvektors zur Runterregulierung der Epsilon-Cyclase, der Expression der *Nostoc punctiforme* Ketolase NP196-1, der Überexpression der chromoplastenspezi-
- 20 fischen B-Hydroxylase aus *Lycopersicon esculentum* der Runterregulierung der B-Hydroxylase aus *Tagetes erecta* sowie der Überexpression der Bgenes aus Tomate blütenspezifisch in *Tagetes erecta*.
- 25 Die Klonierung dieses Fuenffach-Expressionsvektors erfolgt durch Isolierung des 2679 Bp *PmeI-SspI* Fragmentes aus *pMKP1* (siehe Beispiel 37) und Ligierung in dem *Ecl136II*-geschnittenen Vektor *pCSP08* (Beispiel 34). Durch die Ligation entsteht eine T-DNA die fuenf Expressionskassetten enthaelt: erstens die Inverted-Repeat-
- 30 Cassette gerichtet gegen die *Ecyclase* aus *Tagetes erecta*, zweitens eine Kassette zur Überexpression der Ketolase NP196-1 aus *Nostoc punctiforme*, drittens eine Kassette zur Überexpression der chromoplastenspezifischen  $\beta$ -Hydroxylase aus *Lycopersicon esculentum*, viertens eine Inverted-Repeat-Kassette gerichtet gegen die
- 35 B-Hydroxylase aus *Tagetes erecta*, und fuenftens eine Kassette zur Überexpression des Bgenes aus *Lycopersicon esculentum*. Die B-Hydroxylase-Runterregulierungs-Kassette kann in zwei Orientierungen in den Vektor *pCSP08* ligieren. Das hier beschriebene Beispiel *pCSP09* beinhaltet beide resultierenden Versionen *pCSP09F*
- 40 und *pCSP09R* des Vierfach-Expressionsvektors.

Stellvertretend ist hier die Konstruktkarte fuer Version *pCSP09F* des Beispiels *pCSP09* angeben (Abbildung 39, Konstruktkarte). In der Abbildung 39 beinhaltet Fragment *AP3P* (773 bp) den AP3P-

45 Promoter, Fragment *ecycS* (439 bp) die 5'-Region der *Ecyclase* Sequenz aus *Tagetes erecta* in Sense-Orientierung, Fragment *intron* (207 bp) das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens *ST-LS1*, Fragment

## 183

*ecycAS* (440 bp) die 5'-Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* in Antisense-Orientierung, Fragment 35T (763 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

5 Weiterhin beinhaltet Fragment *ocs* (191 bp) das Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthasegens, Fragment *NP196* (762 bp) die Ketolase aus *Nostoc punctiforme*, Fragment *TP* (183 bp) das Transitpeptid des *rbcS* Gens aus Erbse, Fragment *EPSPS* (1761 bp) den EPSPS Promoter.

10 Weiterhin beinhaltet Fragment *EPSPS* (1792 bp) den EPSPS Promoter, das Fragment *crtRb2* (929 bp) die B-Hydroxylase *CrtRb2*, Fragment *LB3* (301 bp) den LB3 Terminator.

15 Weiterhin beinhaltet Fragment *AP3P* (767 bp) den AP3P-Promoter, Fragment 5'*bhydrS* (291 bp) die 5'-Region der B-Hydroxylase aus *Tagetes erecta* in Sense-Orientierung, Fragment *intron* (206 bp) das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens *ST-LS1*, Fragment 5'*bhydrS* (326 bp) die 5'-Region der B-Hydroxylase aus *Tagetes erecta* in Antisense-  
20 Orientierung, und Fragment 35T (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

Weiterhin beinhaltet das Fragment *P76* (1033 bp) den *P76* Promoter, das Fragment *Bgene* (1666 bp) das *Bgene* aus *Lycopersicon esculentum*, und das Fragment 35ST (970 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.  
25

#### Beispiel 36:

Herstellung eines Vierfach-Expressionsvektors zur der Expression  
30 der *Nostoc punctiforme* Ketolase *NP196-1*, der Überexpression der chromoplastenspezifischen B-Hydroxylase aus *Lycopersicon esculentum*, der Runterregulierung der B-Hydroxylase aus *Tagetes erecta* sowie der Ueberexpression der Bgenes aus Tomate blütenspezifisch in *Tagetes erecta*.

35

Der erste Klonierungsschritt erfolgt durch Isolierung des 3103 bp *Ecl136II-XhoI* Fragmentes aus *pCSP04*, nachfolgendes Klenow-Auffüllen des 5'-Ueberhangs der *XhoI*-Schnittstelle (nach Standardmethoden durchgeführt) und schliesslich Ligierung in den  
40 *Ecl136II*-geschnittenen Vektor *pMSP107*. Durch die Ligation entsteht eine T-DNA die zwei Expressionskassetten enthaelt: erstens die Kasette zur Ueberexpression der Ketolase *NP196-1* aus *Nostoc punctiforme*, und zweitens die Kasette zur Ueberexpression der chromoplastenspezifischen  $\beta$ -Hydroxylase aus *Lycopersicon esculentum*. Die  $\beta$ -Hydroxylase-Ueberexpressions-Kasette kann in zwei  
45 Orientierungen in den Vektor *pMSP107* ligieren. Das hier beschrie-

## 184

beine Beispiel pCSP010 beinhaltet beide resultierenden Versionen pCSP10F und pCSP10R des Zweifach-Expressionsvektors.

Der zweite Klonierungsschritt erfolgt durch Isolierung des 2392  
 5 bp *Ecl136II*-*XhoI* Fragmentes aus pCSP06, nachfolgendes Klenow-Auf-  
 fuellen des 5'Ueberhangs der *XhoI*-Schnittstelle (nach Standard-  
 methoden durchgefuehrt) und schliesslich Ligierung in den  
*Ecl136II*-geschnittenen Vektor pCSP10. Die B-Hydroxylase-Runter-  
 regulierungs-Kassette kann in zwei Orientierungen in den Vektor  
 10 pCSP10 ligieren. Das hier beschriebene Beispiel pCSP11 beinhaltet  
 beide resultierenden Versionen pCSP11F und pCSP11R des Dreifach-  
 Expressionsvektors.

Der dritte Klonierungsschritt erfolgt durch Isolierung des 3679  
 15 bp *PmeI*-*SspI*-Fragmentes aus pMKP01 (siehe Beispiel 37) und Ligie-  
 rung in den *Ecl136II*-geschnittenen Vektor pCSP11. Die Bgene-Über-  
 expressions-Kassette kann in zwei Orientierungen in den Vektor  
 pCSP11 ligieren. Das hier beschriebene Beispiel pCSP12 beinhaltet  
 beide resultierenden Versionen pCSP12F und pCSP12R des Vierfach-  
 20 Expressionsvektors.

Stellvertretend ist hier die Konstruktkarte fuer Version pCSP12F  
 des Beispiels pCSP12 angeben (Abbildung 40, Konstruktkarte).

25 In der Abbildung 40 beinhaltet Fragment *ocs* (191 bp) das Poly-  
 adenylierungssignal des Octopin-Synthasegens, Fragment *NP196*  
 (762 bp) die Ketolase aus *Nostoc punctiforme*, Fragment *TP*  
 (183 bp) das Transitpeptid des *rbcS* Gens aus Erbse, Fragment  
*EPSPS* (1761 bp) den EPSPS Promoter.

30 Weiterhin beinhaltet Fragment *EPSPS* (1792 bp) den EPSPS Promoter,  
 das Fragment *crtR-b2* (929 bp) die B-Hydroxylase *CrtRb2*, Fragment  
*LB3* (301 bp) den LB3 Terminator.

35 Weiterhin beinhaltet Fragment *AP3P* (767 bp) den AP3P-Promoter,  
 Fragment *5'bhydrS* (291 bp) die 5'Region der B-Hydroxylase aus  
*Tagetes erecta* in Sense-Orientierung, Fragment *intron* (206 bp) das  
 Intron PIV2 des Kartoffel-Gens *ST-LS1*, Fragment *5'bhydrS* (326 bp)  
 die 5'Region der B-Hydroxylase aus *Tagetes erecta* in Antisense-  
 40 Orientierung, und Fragment *35T* (761 Bp) das Polyadenylierungs-  
 signal von CaMV.

Weiterhin beinhaltet das Fragment *P76* (1033 bp) den P76 Promoter,  
 das Fragment *Bgene* (1666 bp) das Bgene aus *Lycopersicon esculen-*  
 45 *tum*, und das Fragment *35ST* (970 Bp) das Polyadenylierungssignal  
 von CaMV.

## 185

Beispiel 37:

- Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der chromoplastenspezifischen Lycopin beta cyclase aus *Lycopersicon esculentum* unter Kontrolle des Promoters P76 und
- 5 zur blütenspezifischen Expression der Ketolase NP196 aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 unter Kontrolle des EPSPS Promoters

Isolation von Promoter P76 (SEQ ID NO. 168) mittels PCR mit genomischer DNA von *Arabidopsis thaliana* als Matrize.

10

Hierzu wurden die Oligonukleotid Primer P76for (SEQ ID NO. 166) und P76rev (SEQ ID NO. 167) verwendet. Die Oligonukleotide wurden bei der Synthese mit einem 5' Phosphatrest versehen.

- 15 Die genomische DNA wurde aus *Arabidopsis thaliana* wie beschrieben (Galbiati M et al. *Funct. Integr. Genomics* 2000, 20 1:25-34) isoliert.

Die PCR Amplifikation wurde wie folgt durchgeführt:

20

- 80 ng genomische DNA  
1x Expand Long Template PCR Puffer  
2,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
je 350 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP  
25 je 300 nM eines jeden Primers  
2,5 Units Expand Long Template Polymerase  
in einem Endvolumen von 25 µl

Folgendes Temperaturprogramm wird verwendet:

30

- 1 Zyklus mit 120 sec bei 94°C  
35 Zyklen mit 94°C für 10 sec, 48°C für 30 sec und 68°C für 3 min  
1 Zyklus mit 68°C für 10 min

- 35 Das PCR Produkt wird mit Agarosegelelektrophorese gereinigt und das 1032 bp Fragment durch Gelelution isoliert.

Der Vektor pSun5 wird mit der Restriktionsendonuklease EcoRV verdaut und ebenfalls über Agarosegelelektrophorese aufgereinigt und

- 40 durch Gelelution gewonnen.

Das gereinigte PCR Produkt wird in den so behandelten Vektor kloniert.

45



## 186

Um die Orientierung des Promotors im Vektor zu überprüfen wird mit der Restriktionsendonuklease BamHI verdaut. Entsteht hierbei ein 628 bp Fragment ist die Orientierung entsprechend der Abb. 43.

5

Dieses Konstrukt wird mit p76 bezeichnet.

Der 35ST wird aus pJIT 117 durch Verdau mit den Restriktionsendonukleasen KpnI und SmaI gewonnen.

10 Das hierbei entstehende 969 bp Fragment wird mit Agarosegelelektrophorese gereinigt und durch Gelelektion isoliert.

Der Vektor p76 wird ebenfalls mit den Restriktionsendonukleasen KpnI und SmaI verdaut. Das entstehende 7276bp Fragment wird mit Agarosegelelektrophorese gereinigt und durch Gelelektion isoliert.

15 Das so gewonnene 35ST Fragment wird in den so behandelten p76 kloniert.

Der entstehende Vektor wird mit p76\_35ST bezeichnet.

Isolation von Bgene (SEQ ID NO. 171) mittels PCR mit genomischer

20 DNA von *Lycopersicon esculentum* als Matrize.

Hierzu wurden die Oligonukleotid Primer BgeneFor (SEQ ID NO. 169) und BgeneRev (SEQ ID NO. 170) verwendet. Die Oligonukleotide wurden bei der Synthese mit einem 5' Phosphatrest versehen.

25

Die genomische DNA wurde aus *Lycopersicon esculentum* wie beschrieben (Galbiati M et al. Funct. Integr. Genomics 2000, 20 1:25-34) isoliert.

30 Die PCR Amplifikation wurde wie folgt durchgeführt:

80ng genomische DNA

1x Expand Long Template PCR Puffer

2,5 mM MgCl<sub>2</sub>

35 je 350 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP

je 300 nM eines jeden Primers

2,5 Units Expand Long Template Polymerase

in einem Endvolumen von 25 µl

40 Folgendes Temperaturprogramm wurde verwendet:

1 Zyklus mit 120 sec bei 94°C

35 Zyklen mit 94°C für 10 sec, 48°C für 30 sec und 68°C für 3 min

1 Zyklus mit 68°C für 10 min

45

## 187

Das PCR Produkt wurde mit Agarosegelelektrophorese gereinigt und das 1665 bp Fragment durch Gelelution isoliert.

Der Vektor p76\_35ST wird mit der Restriktionsendonuklease SmaI  
5 verdaut und ebenfalls über Agarosegelelektrophorese aufgereinigt und durch Gelelution gewonnen.

Das gereinigte PCR Produkt wird in den so behandelten Vektor kloniert.

10 Um die Orientierung von Bgene im Vektor zu überprüfen wird mit der Restriktionsendonuklease EcoRI verdaut. Entsteht hierbei ein 2216 bp Fragment ist die Orientierung entsprechend der Abb. 43. Dieses Konstrukt wird mit pB bezeichnet.  
pB wird mit den Restriktionsendonukleasen PmeI und SspI verdaut  
15 und das 3906bp Fragment enthaltend den Promoter P76, Bgene und den 35ST durch Agarosegelelektrophorese gereinigt und durch Gelelution gewonnen

MSP108 (Beispiel 21, Abb.25) wird mit der Restriktionsendonuklease  
20 Ecl126II verdaut, durch Agarosegelelektrophorese gereinigt und durch Gelelution gewonnen

Das gereinigte 3906bp Fragment enthaltend den Promoter P76, Bgene und den 35ST aus pB wird in den so behandelten Vector  
25 MSP108 kloniert.

Die Orientierung des Inserts wird durch Restriktionsverdau mit NcoI festgestellt. Entsteht hierbei ein Fragment der Größe 5268bp, ist die Orientierung wie in Abb. XX gezeigt. Dieses Konstrukt wird mit pMKP1 (Abb.44) bezeichnet.

30

Beispiel 38:

Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der chromoplastenspezifischen Lycopin beta cyclase aus *Lycopersicon esculentum* unter Kontrolle des Promoters P76,  
35 zur blütenspezifischen Expression der Ketolase NP196 aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 unter Kontrolle des EPSPS Promoters und zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend 5'terminale Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA (AF251016) unter Kontrolle des AP3P-Promoters

40

Vektor csp1 (Abb. 34, Beispiel 30) wird mit Ecl136II verdaut und mittels Agarosegelelektrophorese gereinigt und durch Gelelution gewonnen.

45 Das 3906bp SspI, PmeI Fragment enthaltend den Promoter P76, Bgene und den 35ST aus pB (siehe Beispiel 37) wird in den so behandelten Vector csp1 kloniert.

## 188

Die Orientierung des Inserts wird durch Restriktionsverdau mit SacI festgestellt. Entsteht hierbei ein Fragment der Größe 3170bp, ist die Orientierung wie in Abb. XX gezeigt.

5 Dieses Konstrukt wird mit pMKP2 (Abb. 44) bezeichnet.

Beispiel 39:

Herstellung und Charakterisierung transgener Tagetes Pflanzen

10 Die Transformation und Regeneration von Tagetes Pflanzen unter Verwendung der Nukleinsäurekonstrukte gemäß den Beispielen 30 bis 38 wurde wie in Beispiel 7 beschrieben durchgeführt.

Die Charakterisierung der transgenen Tagetes Pflanzen erfolgt  
15 wie unter Beispiel 8 und 9 sowie wie in Beispiel 17 beschrieben.

20

25

30

35

40

45

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern aufweisen.  
5
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Pflanzen verwendet, deren Blütenblätter als Wildtyp bereits eine Ketolase-Aktivität aufweisen und die genetische Veränderung eine Erhöhung der Ketolase-Aktivität in Blütenblättern im Vergleich zum Wildtyp bewirkt.  
10
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Ketolase-Aktivität die Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, gegenüber dem Wildtyp erhöht.  
15
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Genexpression Nukleinsäuren in die Pflanze einbringt, die Ketolasen kodieren.  
20
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Pflanzen verwendet, deren Blütenblätter als Wildtyp keine Ketolase-Aktivität aufweisen und die genetische Veränderung eine Ketolase-Aktivität in Blütenblättern im Vergleich zum Wildtyp verursacht.  
25
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Blütenblättern transgen eine Ketolase exprimieren.  
30
7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Verursachung der Genexpression Nukleinsäuren in die Pflanze einbringt, die Ketolasen kodieren.  
35
8. Verfahren nach Anspruch 4 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren einbringt, die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist.  
40  
45

## 190

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 1 einbringt.
10. Verfahren nach Anspruch 4 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren einbringt, die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 16 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 16 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 15 einbringt.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Blüten die höchste Expressionsrate einer Ketolase aufweisen.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Genexpression der Ketolase unter Kontrolle eines blüten-spezifischen Promotors erfolgt.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanzen zusätzlich gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Hydroxylase-Aktivität und  $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass man zur zusätzlichen Erhöhung mindestens einer der Aktivitäten, die Genexpression mindestens einer Nukleinsäure ausgewählt aus der Gruppe, Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxylase und Nukleinsäuren kodierend eine  $\beta$ -Cyclase gegenüber dem Wildtyp erhöht.
16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Genexpression mindestens einer der Nukleinsäuren, mindestens eine Nukleinsäure ausgewählt aus der Gruppe, Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxylase und Nukleinsäuren kodierend eine  $\beta$ -Cyclase in die Pflanze einbringt.
17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase, Nukleinsäuren einbringt die eine Hydroxylase kodieren, enthaltend die

## 191

Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 18 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 18 aufweist.

5

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 17 einbringt.

10 19. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure kodierend eine  $\beta$ -Cyclase, Nukleinsäuren einbringt die eine  $\beta$ -Cyclase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 20 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abge-

15 leitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 20 aufweist.

20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 19 ein-

20 bringt.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Blüten die höchste Expressionsrate einer Hydroxylase

25 und/oder  $\beta$ -Cyclase aufweisen.

22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Genexpression der Hydroxylase und/oder  $\beta$ -Cyclase unter Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors erfolgt.

30

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanzen gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen.

35 24. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass man die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität in Pflanzen durch mindestens eines der nachfolgenden Verfahren erreicht:

a) Einbringen mindestens einer doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressions-

40 kassetten in Pflanzen,

b) Einbringen mindestens einer  $\epsilon$ -Cyclase antisense-Ribonukleinsäuresequenzen oder einer deren Expression gewähr-

45 leistenden Expressionskassette in Pflanzen,

## 192

- 5 c) Einbringen mindestens einer  $\epsilon$ -Cyclase antisense-Ribonukleinsäuresequenz kombiniert mit einem Ribozym oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen,
- 5 d) Einbringen mindestens einer  $\epsilon$ -Cyclase sense-Ribonukleinsäuresequenzen zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette in Pflanzen,
- 10 e) Einbringen mindestens eines DNA-oder Protein-bindenden Faktors gegen ein  $\epsilon$ -Cyclase -Gen, -RNA oder -Protein oder einer dessen Expression gewährleistenden Expressionskassette in Pflanzen,
- 15 f) Einbringen mindestens einer den  $\epsilon$ -Cyclase RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette in Pflanzen,
- g) Einbringen mindestens eines Konstruktes zur Erzeugung einer Insertion, Deletion, Inversion oder Mutation in einem  $\epsilon$ -Cyclase-Gen in Pflanzen.
- 20 25. Verfahren nach Anspruch 24, Ausführungsform a), dadurch gekennzeichnet, dass man in die Pflanze eine RNA einbringt, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die
- 25 a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder
- b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist.
- 30 26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass der Bereich mit Doppel-Strang-Struktur eine Nukleinsäuresequenz enthält, die mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Transkripts identisch ist und das 5'-Ende oder
- 35 das 3'-Ende der Pflanze eigenen Nukleinsäure, kodierend eine  $\epsilon$ -Cyclase enthält.
27. Verfahren nach Anspruch 23 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in
- 40 Blüten die geringste Expressionsrate einer  $\epsilon$ -Cyclase aufweisen.
28. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, dass
- 45 die Transkription der doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 24, Ausführungsform a) und/oder

## 193

der Antisense-Sequenzen gemäß Anspruch 24, Ausführungsform b) unter Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors erfolgt.

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 28, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanzen zusätzlich gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Phytoen-Synthase-Aktivität, Phytoen-Desaturase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität aufweisen.
30. Verfahren nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass man zur zusätzlichen Erhöhung mindestens einer der Aktivitäten, die Genexpression mindestens einer Nukleinsäure ausgewählt aus der Gruppe, Nukleinsäuren kodierend eine HMG-CoA-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase, Nukleinsäuren kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase, Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Desaturase, Nukleinsäuren kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase, Nukleinsäuren kodierend ein crtISO Protein, Nukleinsäuren kodierend ein FtsZ Protein und Nukleinsäuren kodierend ein MinD Protein gegenüber dem Wildtyp erhöht.
31. Verfahren nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Genexpression mindestens einer der Nukleinsäuren, mindestens eine Nukleinsäure ausgewählt aus der Gruppe, Nukleinsäuren kodierend eine HMG-CoA-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase, Nukleinsäuren kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase, Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase,



## 194

- 5 Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Desaturase, Nukleinsäuren kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase, Nukleinsäuren kodierend ein crtISO Protein, Nukleinsäuren kodierend ein FtsZ Protein und Nukleinsäuren kodierend ein MinD Protein in die Pflanze einbringt.
- 10 32. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure kodierend eine HMG-CoA-Reduktase, Nukleinsäuren einbringt die eine HMG-CoA-Reduktase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 100 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität
- 15 von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 100 aufweist.
- 20 33. Verfahren nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 99 einbringt.
- 25 34. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase, Nukleinsäuren einbringt die eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 102 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine
- 30 Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 102 aufweist.
- 35 35. Verfahren nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 101 einbringt.
- 40 36. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase, Nukleinsäuren einbringt die eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 104 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 104 aufweist.
- 45 37. Verfahren nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 103 einbringt.

## 195

38. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase, Nukleinsäuren einbringt die eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 106 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 106 aufweist.
39. Verfahren nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 105 einbringt.
40. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase, Nukleinsäuren einbringt die eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 108 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 108 aufweist.
41. Verfahren nach Anspruch 40, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 107 einbringt.
42. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase, Nukleinsäuren einbringt die eine Geranyl-Diphosphat-Synthase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 110 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 110 aufweist.
43. Verfahren nach Anspruch 42, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 106 einbringt.
44. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase, Nukleinsäuren einbringt die eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 112 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 112 aufweist.

## 196

45. Verfahren nach Anspruch 44, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 111 einbringt.
- 5 46. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure kodierend eine Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase, Nukleinsäuren einbringt die eine Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 114 oder eine von dieser Sequenz durch  
10 Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 114 aufweist.
47. Verfahren nach Anspruch 46, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 113  
15 einbringt.
48. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure kodierend eine Phytoen-Synthase, Nukleinsäuren einbringt die eine Phytoen-Synthase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 116 oder eine von  
20 dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz  
25 SEQ ID NO: 116 aufweist.
49. Verfahren nach Anspruch 48, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 115  
30 einbringt.
50. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure kodierend eine Phytoen-Desaturase, Nukleinsäuren einbringt die eine Phytoen-Desaturase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 118 oder eine von  
35 dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 118 aufweist.
- 40 51. Verfahren nach Anspruch 50, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 117 einbringt.
52. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase, Nukleinsäuren einbringt die eine Zeta-Carotin-Desaturase  
45 kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 120

## 197

oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 120 aufweist.

5

53. Verfahren nach Anspruch 52, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 119 einbringt.

10 54. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure kodierend ein crtISO Protein, Nukleinsäuren einbringt die ein crtISO Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 122 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren  
15 abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 122 aufweist.

55. Verfahren nach Anspruch 54, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 121 ein-  
20 bringt.

56. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure kodierend ein FtsZ Protein, Nukleinsäuren einbringt die ein FtsZ Protein kodieren, enthaltend die  
25 Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 124 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 124 aufweist.

30 57. Verfahren nach Anspruch 56, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 123 einbringt.

58. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass man  
35 als Nukleinsäure kodierend ein MinD Protein, Nukleinsäuren einbringt die ein MinD Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 126 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 %  
40 auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 126 aufweist.

59. Verfahren nach Anspruch 58, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 125 einbringt.

45

## 198

60. Verfahren nach einem der Ansprüche 29 bis 59, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Blüten die höchste Expressionsrate einer HMG-CoA-Reduktase und/oder (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase und/oder Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase und/oder Geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Farnesyl-Diphosphat-Synthase und/oder Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Phytoen-Synthase und/oder Phytoen-Desaturase und/oder Zeta-Carotin-Desaturase und/oder eines crtISO Proteins und/oder eines FtsZ Proteins und/oder eines MinD Proteins aufweisen.
61. Verfahren nach Anspruch 60, dadurch gekennzeichnet, dass die Genexpression der HMG-CoA-Reduktase und/oder (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase und/oder Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase und/oder Geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Farnesyl-Diphosphat-Synthase und/oder Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Phytoen-Synthase und/oder Phytoen-Desaturase und/oder Zeta-Carotin-Desaturase und/oder des crtISO Proteins und/oder des FtsZ Proteins und/oder des MinD Proteins unter Kontrolle eines blüten-spezifischen Promotors erfolgt.
62. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 61, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanzen gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase Aktivität aufweisen.
63. Verfahren nach Anspruch 62, dadurch gekennzeichnet, dass man die Reduzierung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Aktivität in Pflanzen durch mindestens eines der nachfolgenden Verfahren erreicht:
- a) Einbringen mindestens einer doppelsträngigen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen,
  - b) Einbringen mindestens einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase antisense-Ribonukleinsäuresequenzen oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette in Pflanzen,

## 199

- 5 c) Einbringen mindestens einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase antisense-Ribonukleinsäuresequenz kombiniert mit einem Ribozym oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen,
- d) Einbringen mindestens einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase sense-Ribonukleinsäuresequenzen zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette in Pflanzen,
- 10 e) Einbringen mindestens eines DNA-oder Protein-bindenden Faktors gegen ein endogenes  $\beta$ -Hydroxylase-Gen, -RNA oder -Protein oder einer dessen Expression gewährleistenden Expressionskassette in Pflanzen,
- 15 f) Einbringen mindestens einer den endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette in Pflanzen,
- 20 g) Einbringen mindestens eines Konstruktes zur Erzeugung einer Insertion, Deletion, Inversion oder Mutation in einem endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Gen in Pflanzen.
64. Verfahren nach Anspruch 63, Ausführungsform a), dadurch gekennzeichnet, dass man in die Pflanze eine RNA einbringt, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und
- 25 in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die
- a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen, endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Transkripts identisch ist und/oder
- 30 b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen, endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Promotor-Sequenz identisch ist.
65. Verfahren nach Anspruch 64, dadurch gekennzeichnet, dass der Bereich mit Doppel-Strang-Struktur eine Nukleinsäuresequenz
- 35 enthält, die mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen, endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Transkripts identisch ist und das 5'-Ende oder das 3'-Ende der Pflanze eigenen Nukleinsäure, kodierend eine endogene  $\beta$ -Hydroxylase enthält.
- 40 66. Verfahren nach Anspruch 62 bis 65, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Blüten die geringste Expressionsrate einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase aufweisen.

## 200

67. Verfahren nach Anspruch 66, dadurch gekennzeichnet, dass die Transkription der doppelsträngigen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Ribonukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 63, Ausführungsform a) und/oder der Antisense-Sequenzen gemäß Anspruch 63, Ausführungsform b) unter Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors erfolgt.
68. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 67, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanze eine Pflanze verwendet, die in Blütenblättern Chromoplasten aufweist.
69. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 68, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanze eine Pflanze, ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Illiaceae oder Lamiaceae verwendet.
70. Verfahren nach Anspruch 65, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanze eine Pflanze, ausgewählt aus den Pflanzengattungen Marigold, Tagetes erecta, Tagetes patula, Acacia, Aconitum, Adonis, Arnica, Aquilegia, Aster, Astragalus, Bignonia, Calendula, Caltha, Campanula, Canna, Centaurea, Cheiranthus, Chrysanthemum, Citrus, Crepis, Crocus, Curcubita, Cytisus, Delonia, Delphinium, Dianthus, Dimorphotheca, Doronicum, Eschscholtzia, Forsythia, Fremontia, Gazania, Gelsemium, Genista, Gentiana, Geranium, Gerbera, Geum, Grevillea, Helenium, Helianthus, Hepatica, Heracleum, Hisbiscus, Heliopsis, Hypericum, Hypochoeris, Impatiens, Iris, Jacaranda, Kerria, Laburnum, Lathyrus, Leontodon, Lilium, Linum, Lotus, Lycopersicon, Lysimachia, Maratia, Medicago, Mimulus, Narcissus, Oenothera, Osmanthus, Petunia, Photinia, Physalis, Phyteuma, Potentilla, Pyracantha, Ranunculus, Rhododendron, Rosa, Rudbeckia, Senecio, Silene, Silphium, Sinapsis, Sorbus, Spartium, Tecoma, Torenia, Tragopogon, Trollius, Tropaeolum, Tulipa, Tussilago, Ulex, Viola oder Zinnia verwendet.
71. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 70, dadurch gekennzeichnet, dass man nach dem Kultivieren die genetisch veränderten Pflanzen erntet und anschließend die Ketocarotinoide aus den Blütenblättern der Pflanzen isoliert.

## 201

72. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 71, dadurch gekennzeichnet, dass die Ketocarotinoide ausgewählt sind aus der Gruppe Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin.
- 5 73. Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen blütenspezifischen Promotor und eine Nukleinsäure codierend eine Ketolase.
- 10 74. Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen blütenblattspezifischen Promotor und eine Nukleinsäure codierend eine Ketolase.
- 15 75. Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend mindestens eine Nukleinsäure kodierend eine Ketolase und zusätzlich mindestens eine weitere Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe
- a) Nukleinsäuren kodierend eine  $\beta$ -Cyclase,
  - b) Nukleinsäuren kodierend eine  $\beta$ -Hydroxylase,
  - c) Nukleinsäuren kodierend eine HMG-CoA-Reduktase,
  - 20 d) Nukleinsäuren kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase
  - e) Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase,
  - f) Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase,
  - 25 g) Nukleinsäuren kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase,
  - h) Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase,
  - i) Nukleinsäuren kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase,
  - 30 j) Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase,
  - k) Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Synthase,
  - l) Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Desaturase,
  - 35 m) Nukleinsäuren kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase,
  - n) Nukleinsäuren kodierend ein crtISO Protein,
  - o) Nukleinsäuren kodierend ein FtsZ Protein,
  - p) Nukleinsäuren kodierend ein MinD Protein,
  - q) doppelsträngige endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Ribonukleinsäuresequenz und/oder endogene  $\beta$ -Hydroxylase antisense-Ribonukleinsäuresequenzen und
  - 40 r) doppelsträngige  $\epsilon$ -Cyclase- Ribonukleinsäuresequenz und/oder  $\epsilon$ -Cyclase antisense-Ribonukleinsäuresequenz,
- wobei die Nukleinsäuren mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.
- 45



## 202

76. Doppelsträngiges RNA-Molekül umfassend
- 5 a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA- $\epsilon$ -Cyclase Transkriptes, und
- 10 b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen komplementär ist.
77. Doppelsträngiges RNA-Molekül umfassend
- 15 a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes des Promotorbereichs eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens, und
- 20 b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen komplementär ist.
78. Doppelsträngiges RNA-Molekül nach Anspruch 76, wobei die aus dem  $\epsilon$ -Cyclase-Transkript ableitbare cDNA-Sequenz durch SEQ ID NO: 38 beschrieben ist.
- 25 79. Doppelsträngiges RNA-Molekül nach Anspruch 77, wobei die Nukleinsäuresequenz des Promotorbereichs des  $\epsilon$ -Cyclase-Gens durch SEQ ID NO: 47 beschrieben ist.
- 30 80. Doppelsträngiges RNA-Molekül nach einem der Ansprüche 76 bis 79, wobei "sense"-RNA-Strang und "antisense"-RNA-Strang kovalent in Form eines invertierten Repeats miteinander verbunden sind.
81. Doppelsträngiges RNA-Molekül umfassend
- 35 a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase, und
- 40 b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen komplementär ist.
- 45

## 203

82. Doppelsträngiges RNA-Molekül umfassend

- 5 a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes des Promotorbereichs des endogenen  $\beta$ -Hydroxylase -Gens, und
- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen komplementär ist.

10

83. Doppelsträngiges RNA-Molekül nach Anspruch 83, wobei die aus dem endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Transkript ableitbare cDNA-Sequenz durch SEQ ID NO: 103 beschrieben ist.

- 15 84. Transgene Expressionskassette enthaltend in funktioneller Verknüpfung mit einem in pflanzlichen Organismen funktionellen Promotor eine Nukleinsäuresequenz transkribierend ein doppelsträngiges RNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 76 bis 83.

20

85. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 84, wobei der Promotor ein blütenspezifischer Promotor ist.

- 25 86. Genetisch veränderte Pflanze, wobei die genetische Veränderung die Aktivität einer Ketolase in Blütenblättern,

A für den Fall, dass die Wildtyppflanze bereits eine Ketolase-Aktivität in Blütenblättern aufweist, gegenüber dem Wildtyp erhöht und

30

B für den Fall, dass die Wildtyppflanze keine Ketolase-Aktivität in Blütenblättern aufweist, gegenüber dem Wildtyp verursacht.

- 35 87. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 86, dadurch gekennzeichnet, dass die Erhöhung oder Verursachung der Ketolase-Aktivität durch eine Erhöhung oder Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Ketolase gegenüber dem Wildtyp bewirkt wird.

40

88. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 87, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung oder Verursachung der Genexpression Nukleinsäuren in die Pflanze einbringt, die Ketolasen kodieren.

45

## 204

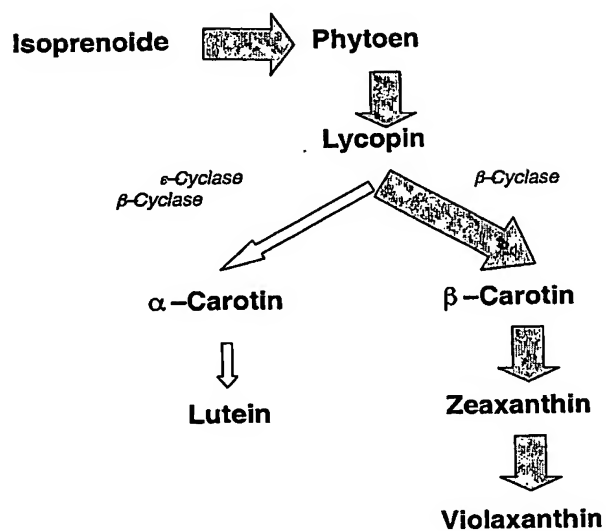
89. Genetisch veränderte Pflanze, die in den Blütenblättern Chromoplasten aufweist, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderte Pflanze mindestens eine transgene Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase enthält.
- 5
90. Genetisch veränderte Pflanze nach einem der Ansprüche 86 bis 89, dadurch gekennzeichnet, dass die genetische Veränderung zusätzlich mindestens eine der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Hydroxylase-Aktivität und  $\beta$ -Cyclase-Aktivität gegenüber einer Wildtyppflanze erhöht.
- 10
91. Genetisch veränderte Pflanze nach einem der Ansprüche 86 bis 90, dadurch gekennzeichnet, dass die genetische Veränderung zusätzlich die  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität gegenüber einer Wildtyppflanze reduziert.
- 15
92. Genetisch veränderte Pflanze nach einem der Ansprüche 86 bis 91, dadurch gekennzeichnet, dass die genetische Veränderung zusätzlich mindestens eine der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranylgeranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Phytoen-Synthase-Aktivität, Phytoen-Desaturase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität gegenüber einer Wildtyppflanze erhöht.
- 20
- 25
- 30
93. Genetisch veränderte Pflanze nach einem der Ansprüche 86 bis 92, dadurch gekennzeichnet, dass die genetische Veränderung zusätzlich die endogene  $\beta$ -Hydroxylase Aktivität gegenüber einer Wildtyppflanze reduziert.
- 35
94. Genetisch veränderte Pflanze nach einem der Ansprüche 86 bis 93, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanze ausgewählt ist aus den Pflanzenfamilien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Illiaceae oder Lamiaceae.
- 40
- 45

## 205

95. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 94, ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzengattungen Marigold, Tagetes erecta, Tagetes patula, Lycopersicon, Rosa, Calendula, Physalis, Medicago, Helianthus, Chrysanthemum, Aster, Tulipa, Narcissus, Petunia, Geranium, oder Tropaeolum oder Adonis.
96. Genetisch veränderte Pflanze nach einem der Ansprüche 86 bis 95, dadurch gekennzeichnet, dass die Ketolase in Blütenblättern exprimiert wird.
97. Genetisch veränderte Pflanze nach einem der Ansprüche 86 bis 96, dadurch gekennzeichnet, dass die Expressionsrate einer Ketolase in Blütenblättern am höchsten ist.
98. Verwendung der genetisch veränderten Pflanzen nach einem der Ansprüche 86 bis 97 als Zierpflanzen oder als Futter- und Nahrungsmittel.
99. Verwendung der Blütenblätter der genetisch veränderten Pflanzen nach einem der Ansprüche 86 bis 97 zur Herstellung von Ketocarotinoid-haltigen Extrakten oder zur Herstellung von Futter- und Nahrungsergänzungsmitteln.
100. Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen gemäß Anspruch 97, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen blütenspezifischen Promotor und Nukleinsäuren kodierend eine Ketolase in das Genom der Ausgangspflanze einführt.

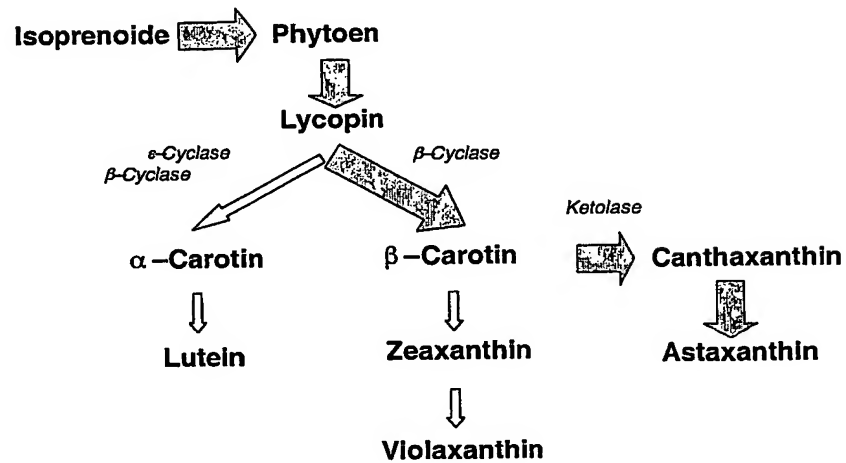
1/47

Abbildung 1: Biosyntheschema von Carotinoiden in Tomatenblüten



2/47

Abbildung 2: Biosyntheschema von Astaxanthin in genetisch veraenderten Blüten



## Abbildung 3: Nukleotidsequenzvergleich

KETO2.seq	ATGCAGCTAGCAGCGACAGTAATGTTGGAGCAGCTTAACCGAAGCCCTGAGGCACTCAAGGAGAAGGAGAAGGAGGTTGCAGGCACTCTGACGGTGTTC	100
X86782.seq	ATGCAGCTAGCAGCGACAGTAATGTTGGAGCAGCTTAACCGAAGCCCTGAGGCACTCAAGGAGAAGGAGAAGGAGGTTGCAGGCACTCTGACGGTGTTC	100
KETO2.seq	GTACATGCGCGAACCAGTACTGCTTCCGTCAGAGGAGTCAGAGCGCGCGCGCGCGCGGACTGAAGAATGCCTACAAGGCACCACTTCCGACACAAAGCG	200
X86782.seq	GTACATGCGCGAACCAGTACTGCTTCCGTCAGAGGAGTCAGAGCGCGCGCGCGCGGACTGAAGAATGCCTACAAGGCACCACTTCCGACACAAAGCG	200
KETO2.seq	CATCACAATGGCGCTAGCTGTCAATCGGCTCCTGGGCGCCAGTGTCTCCAGCCCAATTTTCAAATCAAGCTTCGAGCTCTTGGACCACTGCACCTGG	300
X86782.seq	CATCACAATGGCGCTAGCTGTCAATCGGCTCCTGGGCGCCAGTGTCTCCAGCCCAATTTTCAAATCAAGCTTCGAGCTCTTGGACCACTGCACCTGG	300
KETO2.seq	CTGCGCGTGTTCAGATGCCACAGCTCAGCTGGTTAGCGGCAGCAGCAGCCTGCTGCACATCGTGTAGTATTCCTTTGTCTGGAGTCTCTGTACACAGGC	400
X86782.seq	CTGCGCGTGTTCAGATGCCACAGCTCAGCTGGTTAGCGGCAGCAGCAGCCTGCTGCACATCGTGTAGTATTCCTTTGTCTGGAGTCTCTGTACACAGGC	400
KETO2.seq	TTTTTATCACCACCGCATGATGCTATGCATGCCACCATGCCATGAGAAACAGGCAGCTTAATGACTTCCTTGGGCAGAGTATGCATCTCCTTGTAAGGCTG	500
X86782.seq	TTTTTATCACCACCGCATGATGCTATGCATGCCACCATGCCATGAGAAACAGGCAGCTTAATGACTTCCTTGGGCAGAGTATGCATCTCCTTGTAAGGCTG	500
KETO2.seq	GTTTGATTACAACATGCTGCAACCGCAAGCAITGGGAGCACCACAACACACTGGCGAGGTGGGCAAGGACCTGACTTCCACAGCGGAAACCTGCCATT	600
X86782.seq	GTTTGATTACAACATGCTGCAACCGCAAGCAITGGGAGCACCACAACACACTGGCGAGGTGGGCAAGGACCTGACTTCCACAGCGGAAACCTGCCATT	600
KETO2.seq	GTGCGCTGGTTTGGCAGCTTCATGTCCAGCTACATGTGATGTGGCAGTTCGGCGCGCTCCCATGGTGGACGGTGGTCAATCAGCTGCTGGGTGGGCCAA	700
X86782.seq	GTGCGCTGGTTTGGCAGCTTCATGTCCAGCTACATGTGATGTGGCAGTTCGGCGCGCTCCCATGGTGGACGGTGGTCAATCAGCTGCTGGGTGGGCCAA	700
KETO2.seq	TGGCGAAGCTGCTGGTGTTCATGGGCGCGCGCGCCATCCTGTGCGGCTTCCGCTTGTCTACTTTGGCAGGTACATGCCCCACAAGCCTGAGCCTGGGCG	800
X86782.seq	TGGCGAAGCTGCTGGTGTTCATGGGCGCGCGCGCCATCCTGTGCGGCTTCCGCTTGTCTACTTTGGCAGGTACATGCCCCACAAGCCTGAGCCTGGGCG	800
KETO2.seq	CGGGTCAGGCTCTTCACACGCGGTCACTGAACCTGGTGGAGTGGGCACTAGCCAGGGTCCGAACTGGTCAGCTTTCTGAACTGCTACCACTTCGACCTG	900
X86782.seq	CGGGTCAGGCTCTTCACACGCGGTCACTGAACCTGGTGGAGTGGGCACTAGCCAGGGTCCGAACTGGTCAGCTTTCTGAACTGCTACCACTTCGACCTG	900
KETO2.seq	CACCTGGGAGCACCAACCGCTGGGCGCTTTGCGCGCTGGTGGAGCTGCCAACTGGCGCGCGCTGTCTGGCGAGGTCTGGTCTCTGCTAG	990
X86782.seq	CACCTGGGAGCACCAACCGCTGGGCGCTTTGCGCGCTGGTGGAGCTGCCAACTGGCGCGCGCTGTCTGGCGAGGTCTGGTCTCTGCTAG	990

4/47

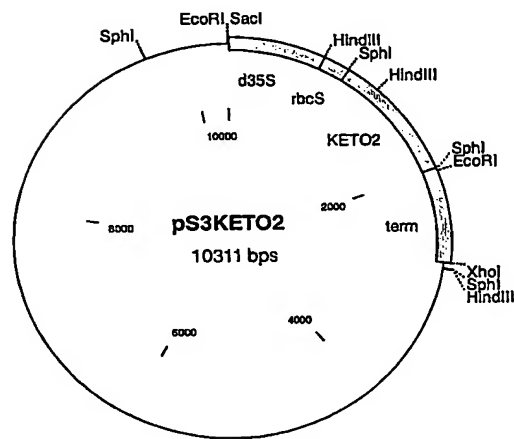
## Abbildung 4: Proteinsequenzvergleich

KETO2.pro	MQLAATVMLEQLTGSAEALKEKEKEVAGSSDVLRTWATQYSLPSEESDAA	50
X86782.pro	MQLAATVMLEQLTGSAEALKEKEKEVAGSSDVLRTWATQYSLPSEESDAA	50
KETO2.pro	RPGLKNAYKPPPSDTKGITMALAVIGSWAAVFLHAI FQIKLP TSLDQLHW	100
X86782.pro	RPGLKNAYKPPPSDTKGITMALRVIIGSWAAVFLHAI FQIKLP TSLDQLHW	100
KETO2.pro	LPVSDATAQLVSGSSSLLHIVVVFFVLEFLYTGLFITTHDAMHGTIAMRN	150
X86782.pro	LPVSDATAQLVSGTSSLLDII VVVFFVLEFLYTGLFITTHDAMHGTIAMRN	150
KETO2.pro	RQLNDFLGRVCI SLYAWFDYNMLHRKHWEHNNHTGEV GKDPDFHRGNPGI	200
X86782.pro	RQLNDFLGRVCI SLYAWFDYNMLHRKHWEHNNHTGEV GKDPDFHRGNPGI	200
KETO2.pro	VPWFASFMS SYMSMWQFARLAWWTVVMQLLGAPMANLLVFMAAAPILSAF	250
X86782.pro	VPWFASFMS SYMSMWQFARLAWWTVVMQLLGAPMANLLVFMAAAPILSAF	250
KETO2.pro	RLFYFGTYMPHKPEPGAASGSSPAVMNWWKSRTSQASDLVSFLT CYHFDL	300
X86782.pro	RLFYFGTYMPHKPEPGAASGSSPAVMNWWKSRTSQASDLVSFLT CYHFDL	300
KETO2.pro	HWEHHRWPFAPWWE L PNCRRLSGRGLVPA	320
X86782.pro	HWEHHRWPFAPWWE L PNCRRLSGRGLVPA	320



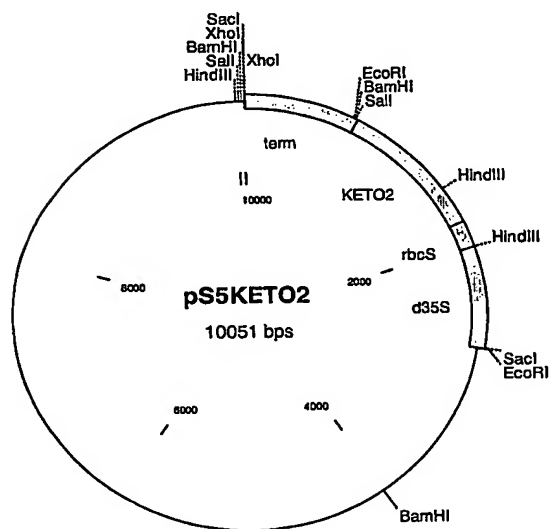
5/47

Abbildung 5A: Konstrukt zur Überexpression der Ketolase ( $\beta$ -C-4-Oxygenase) Proteins aus *H. pluvialis* mit rbcS Transitpeptid aus Erbse unter Kontrolle des d35S-Promoters (Tomatentransformationskonstrukt)



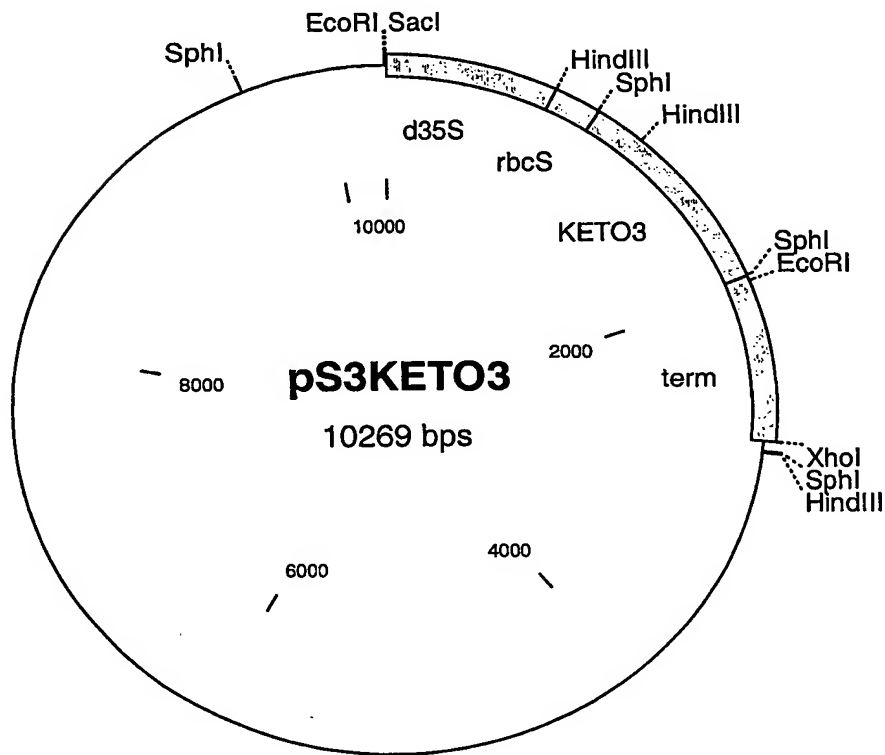
6/47

Abbildung 5B: Konstrukt zur Überexpression des Ketolase ( $\beta$ -C-4-Oxygenase) Proteins aus *H. pluvialis* mit rbcS Transitpeptid aus Erbse unter Kontrolle des d35S-Promoters (Zielfesttransformationskonstrukt)



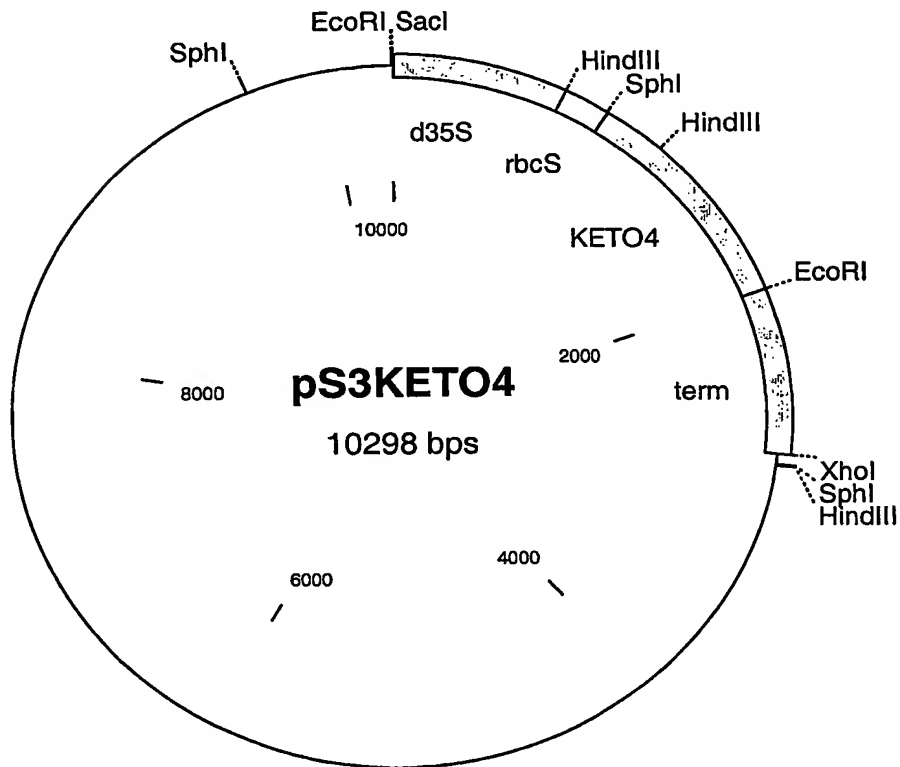
7/47

Abbildung 6: Konstrukt zur Überexpression des N-terminal verkürzten Ketolase ( $\beta$ -C-4-Oxygenase) Proteins aus *H. pluvialis* mit rbcS Transitpeptid aus Erbse unter Kontrolle des d35S-Promoters.



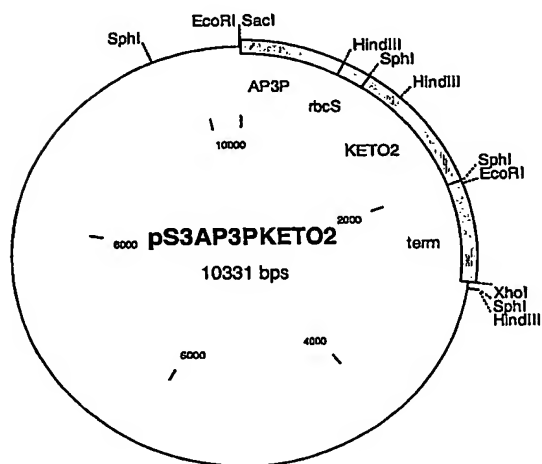
8/47

Abbildung 7: Konstrukt zur Überexpression des Ketolase ( $\beta$ -C-4-Oxygenase) Protein aus *H. pluvialis* mit rbcS Transitpeptid aus Erbse und C-terminalem myc-Tag unter Kontrolle des d35S-Promoters.



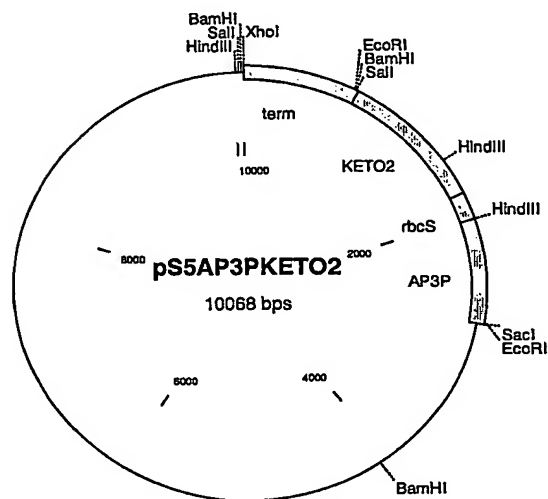
9/47

Abbildung 8A: Konstrukt pS3AP3PKETO2 zur Überexpression des Ketolase ( $\beta$ -C-4-Oxygenase) Proteins aus *H. pluvialis* mit rbcS Transitpeptid aus Erbse unter Kontrolle des AP3P-Promoters (Tomatentransformationskonstrukt).



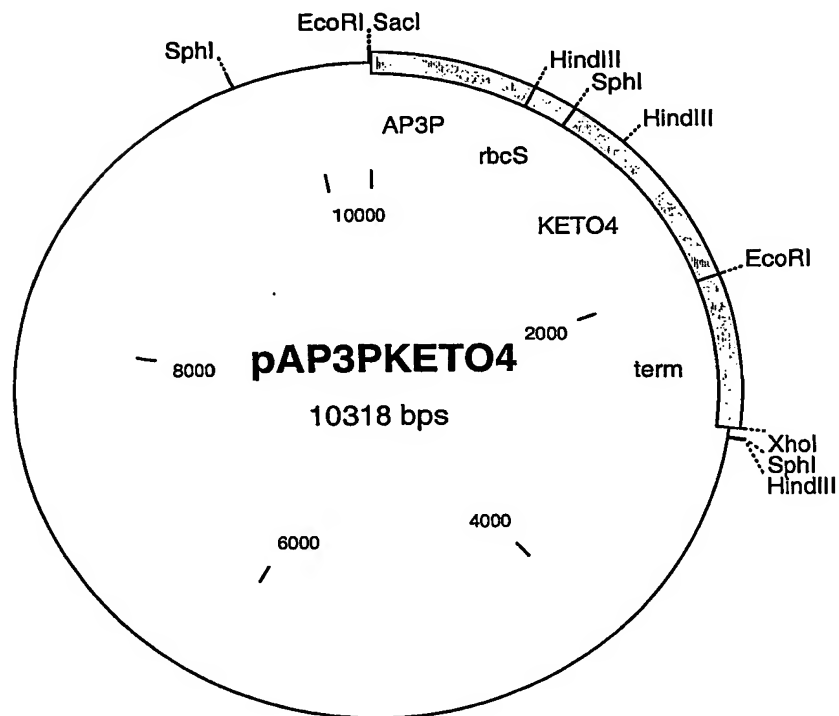
10/47

Abbildung 8B: Konstrukt pS5AP3PKETO2 zur Überexpression der Ketolase ( $\beta$ -C-4-Oxygenase) Proteins aus *H. pluvialis* mit *rbcS* Transitpeptide aus Erbse unter Kontrolle des AP3P-Promoters (Tagetestransformationskonstrukt).



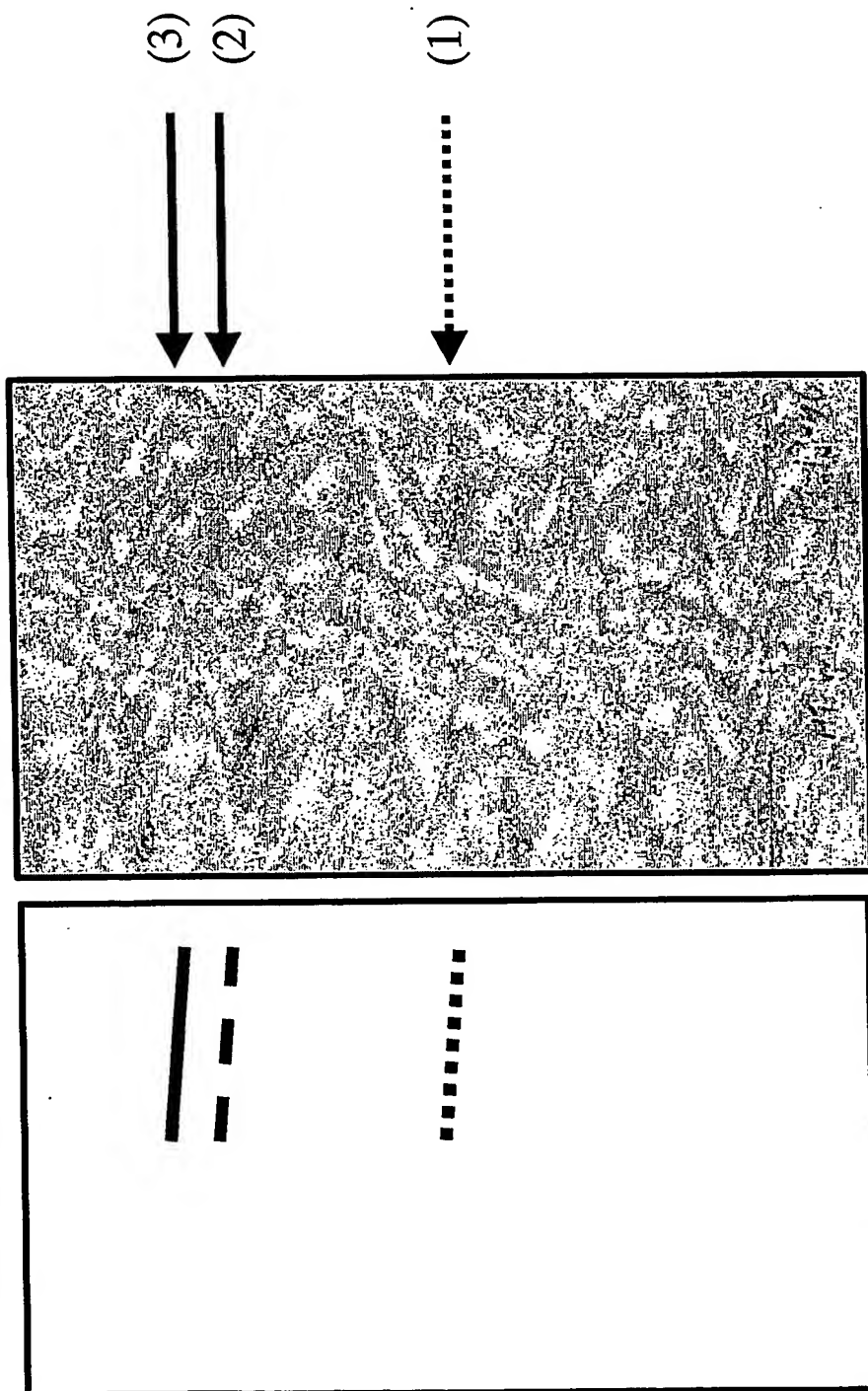
11/47

Abbildung 9: Konstrukt zur Überexpression des Ketolase ( $\beta$ -C-4-Oxygenase) Protein aus *H. pluvialis* mit rbcS Transitpeptid aus Erbse und C-terminalem myc-Tag unter Kontrolle des AP3P-Promoters.



12/47

Abbildung 9a: Esterauftrennung mittels Dünnschichtchromatographie



Linksschematische Darstellung , rechts Foto der Dünnschichtplatte . (3) und (2) deuten auf Ketocarotinoid -Diester , (1) auf Ketocarotinoid -Monoester



13/47

Fig. 10

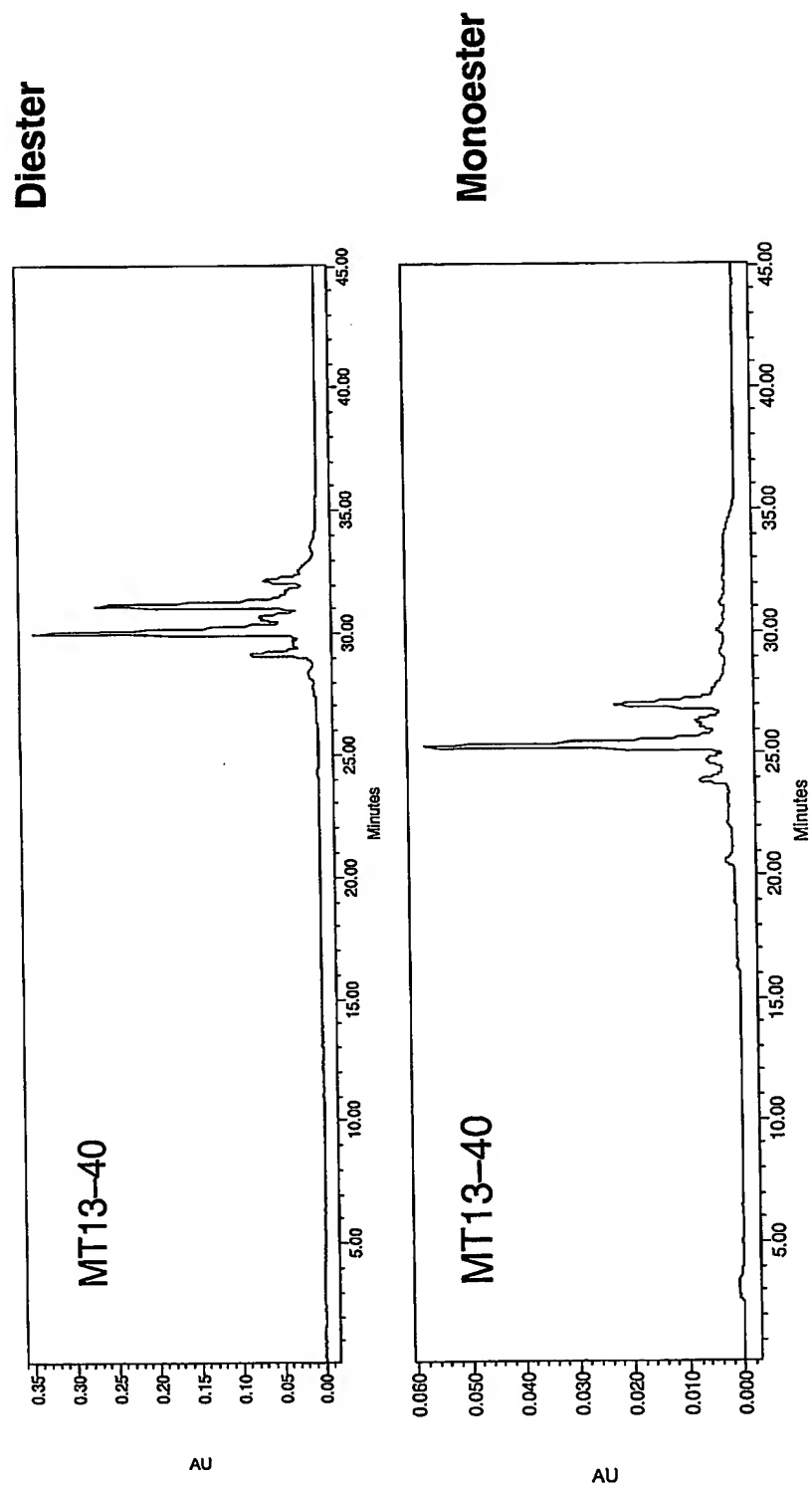
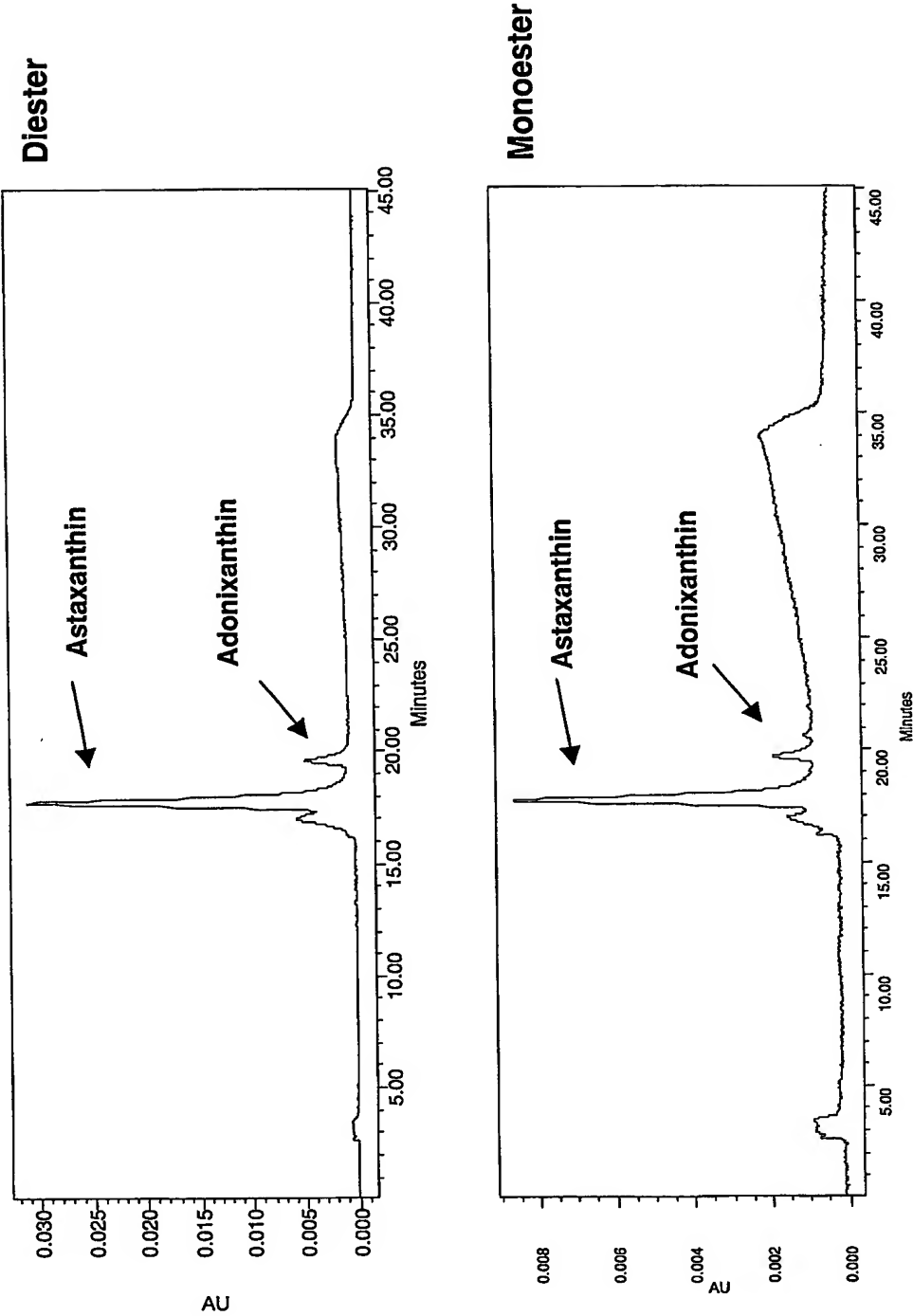
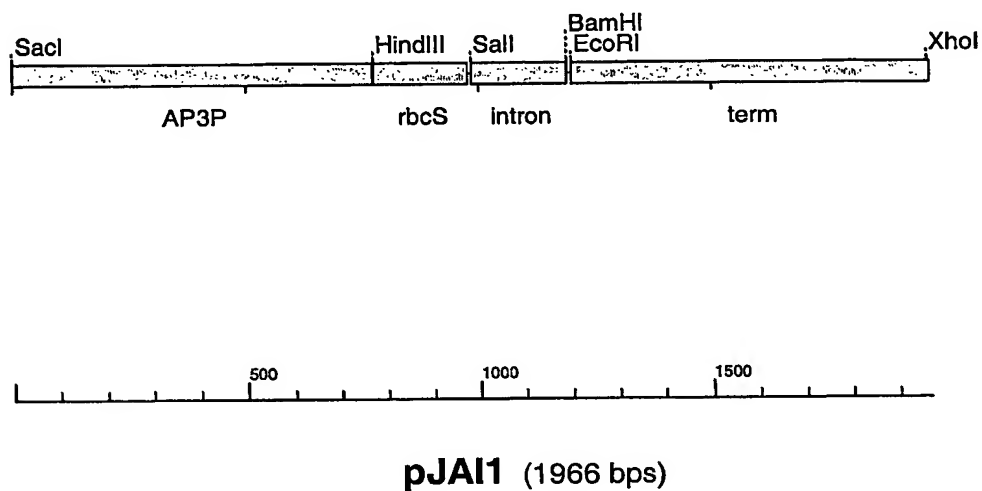


Fig. 11



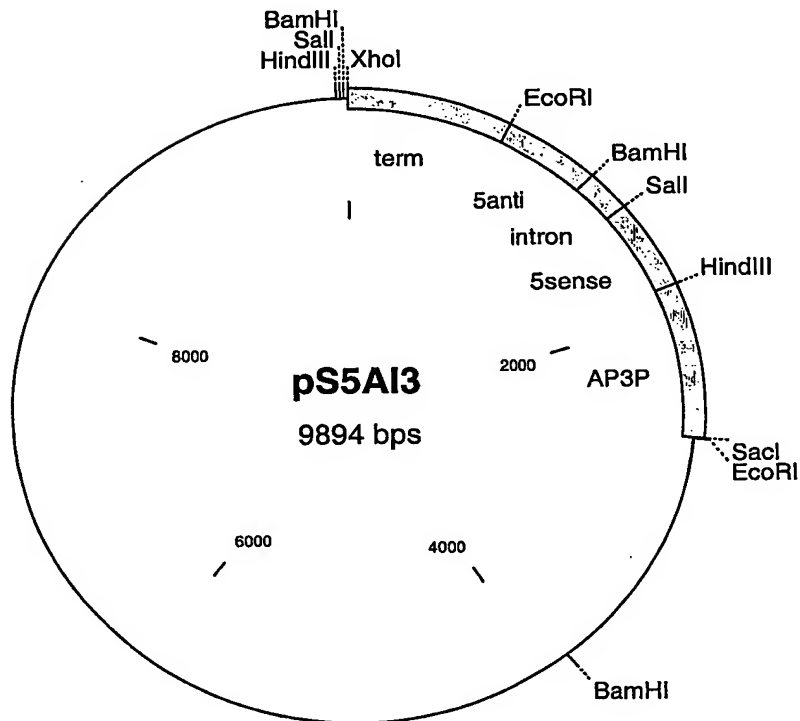
15/47

Abbildung 12: Klonierungskassette zur Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die blüten-spezifische Expression von Epsilon-Cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta*



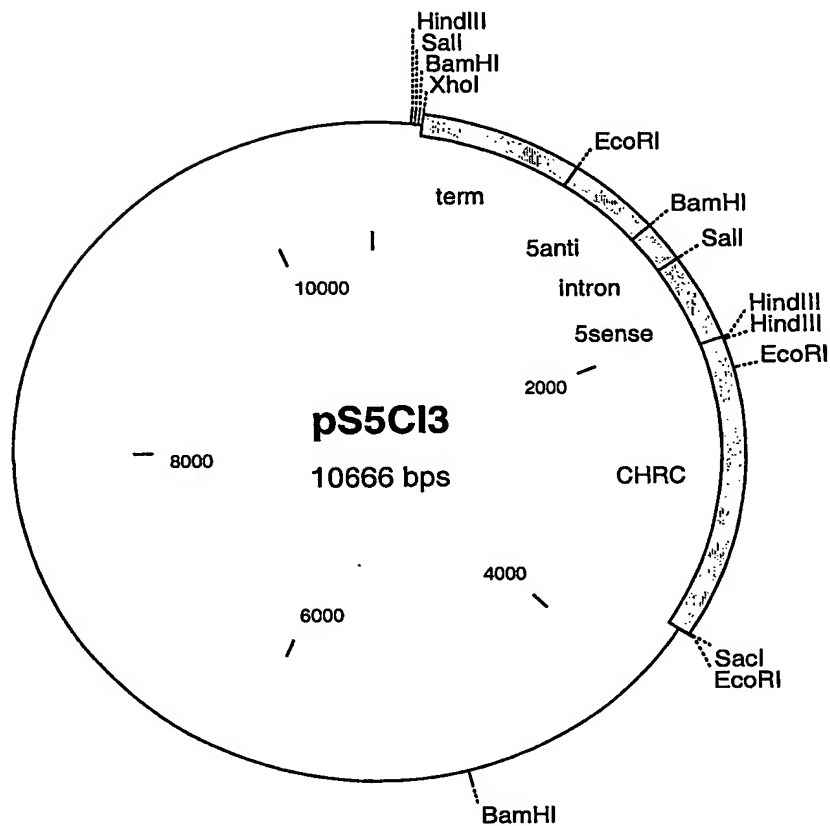
16/47

Abbildung 13: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend 5'terminale Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA (AF251016) unter Kontrolle des AP3P-Promoters



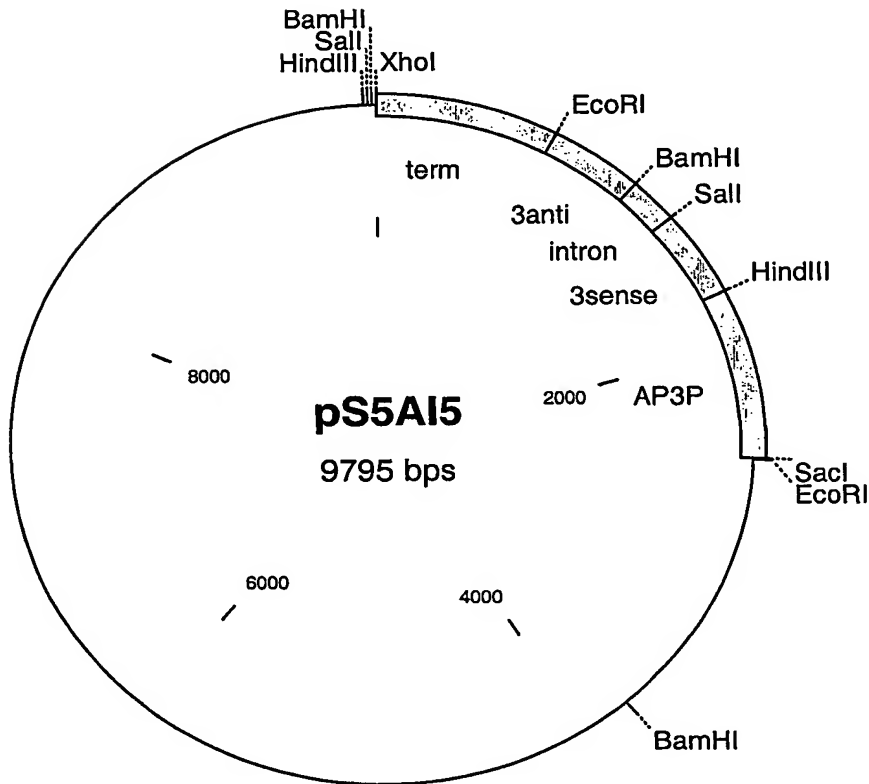
17/47

Abbildung 14: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend 5'terminalen Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA (AF251016) unter Kontrolle des CHRC-Promoters



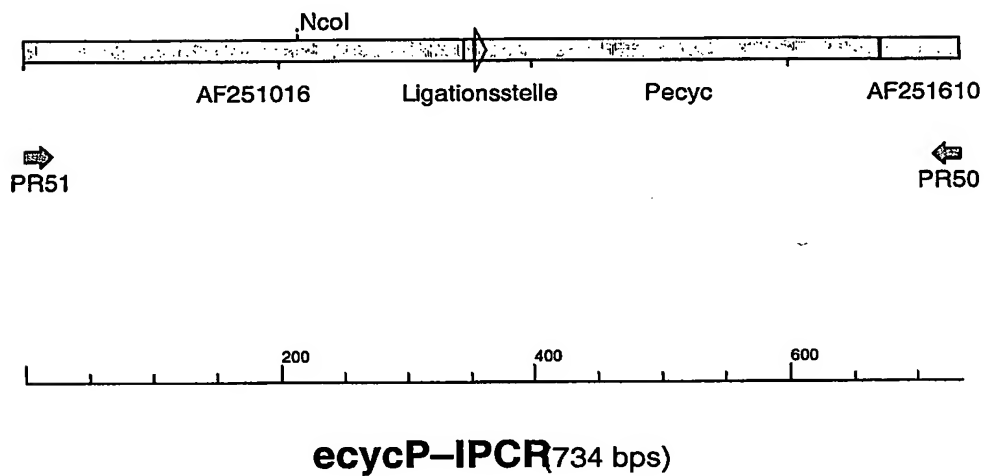
18/47

Abbildung 15: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend 3'terminale Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA (AF251016) unter Kontrolle des AP3P-Promoters



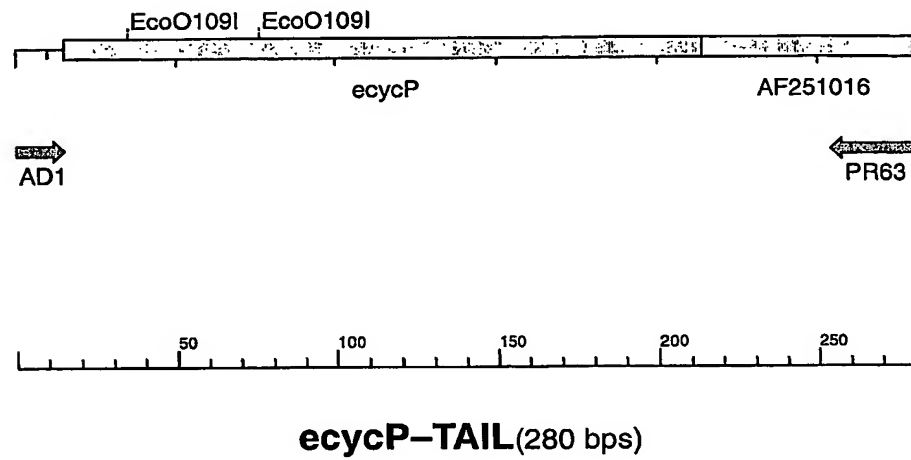
19/47

Abbildung 16: Inverse PCR-Amplifikat, das das 312 bp Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters enthält



20/47

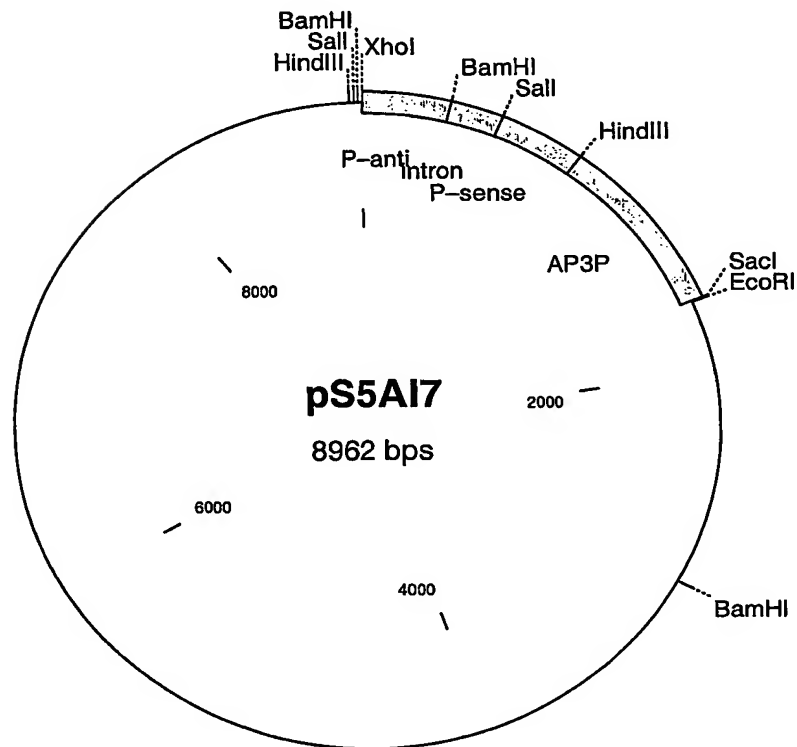
Abbildung 17: TAIL PCR-Amplifikat, das das 199 bp Fragment  
DES Epsilon-Cyclase Promoters enthält





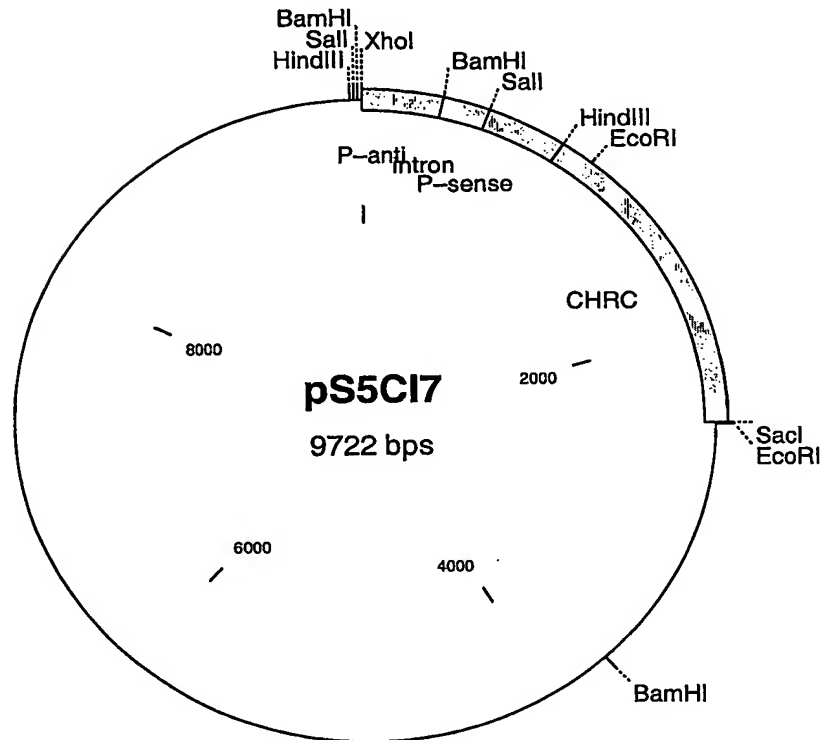
21/47

Abbildung 18: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp5 Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle des AP3P-Promoters



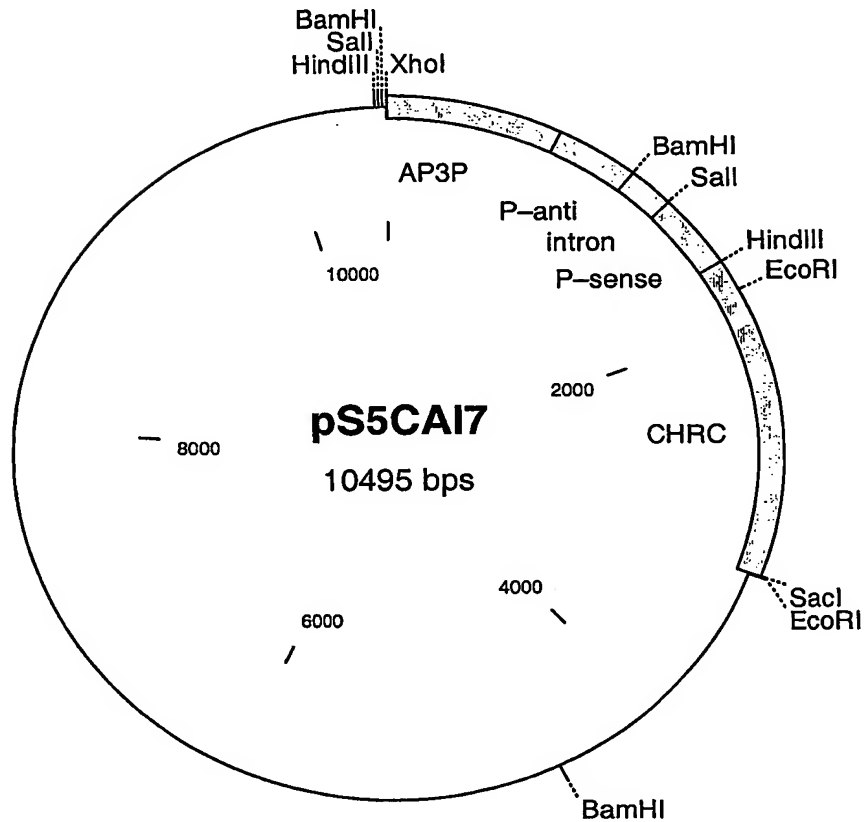
22/47

Abbildung 19: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle des CHRC-Promoters



23/47

Abbildung 20: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp5 Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle sowohl des AP3P-Promoters als auch des CHRC-Promoters



24/47

Abbildung 21: Konstrukt zur bluetenspezifischen Überexpression des Ketolase ( $\beta$ -C-4-Oxygenase) Proteins aus *H. pluvialis* ohne heterologes Transitpeptid.

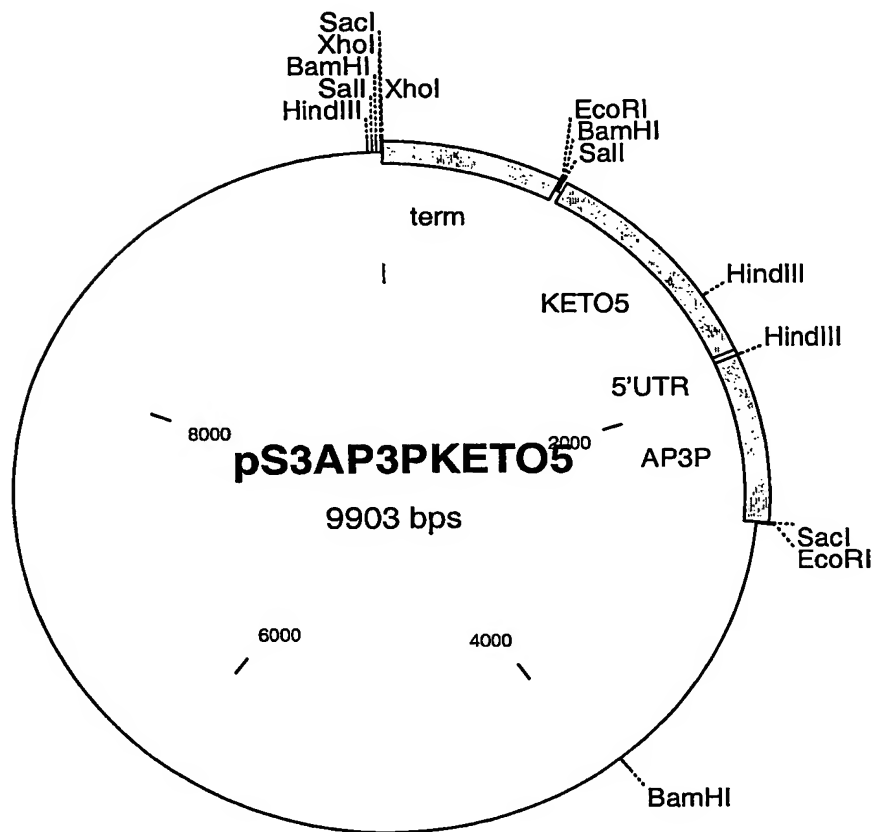
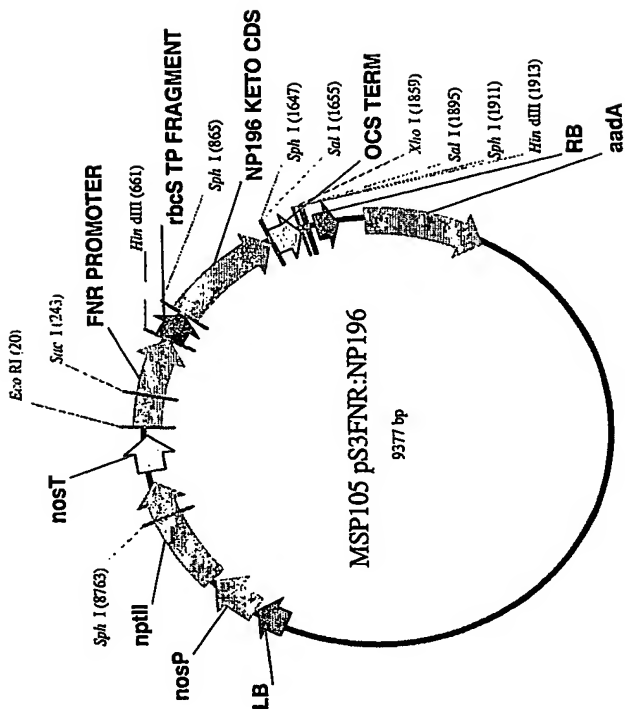
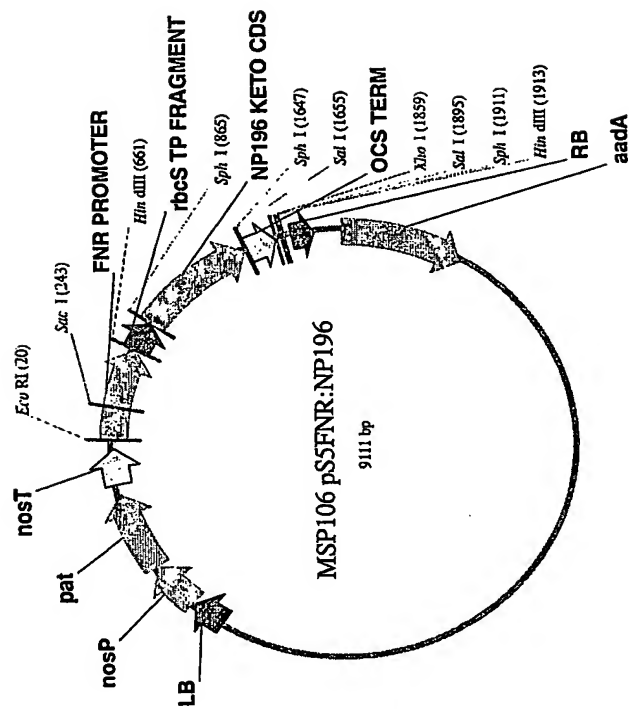


Abbildung 22: pSUN3 konstrukt zur Überexpression des  $\beta$ -C-4-Oxygenase Protein NP196 aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 mit rbcS Transsitpeptid aus Erbsen unter Kontrolle des FNR-Promoters



26/47

Abbildung 23: pSUN5 konstrukt zur Überexpression des  $\beta$ -C-4-Oxygenase Protein NP196 aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 mit rbcS Transitpeptid aus Erbse unter Kontrolle des FNR-Promoters



27/47

Abbildung 24: pSUN3 konstrukt zur Überexpression des  $\beta$ -C-4-Oxygenase Protein NP196 aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 mit rbcS Transitpeptid aus Erbse unter Kontrolle des EPSPS-Promoters

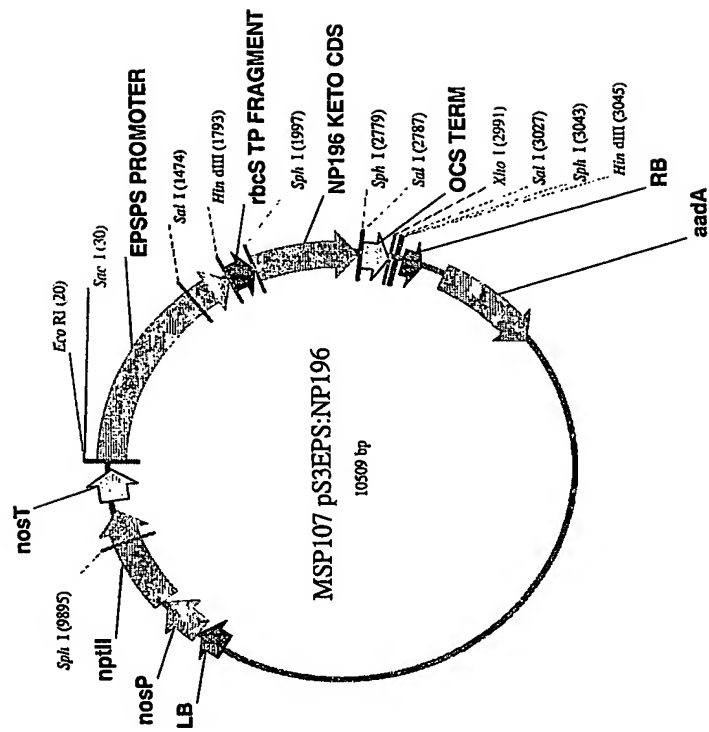


Abbildung 25: pSUN5 konstrukt zur Überexpression des  $\beta$ -C-4-Oxygenase Protein NP196 aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 mit rbcS Transitpeptid aus Erbse unter Kontrolle des EPSPS-Promoters

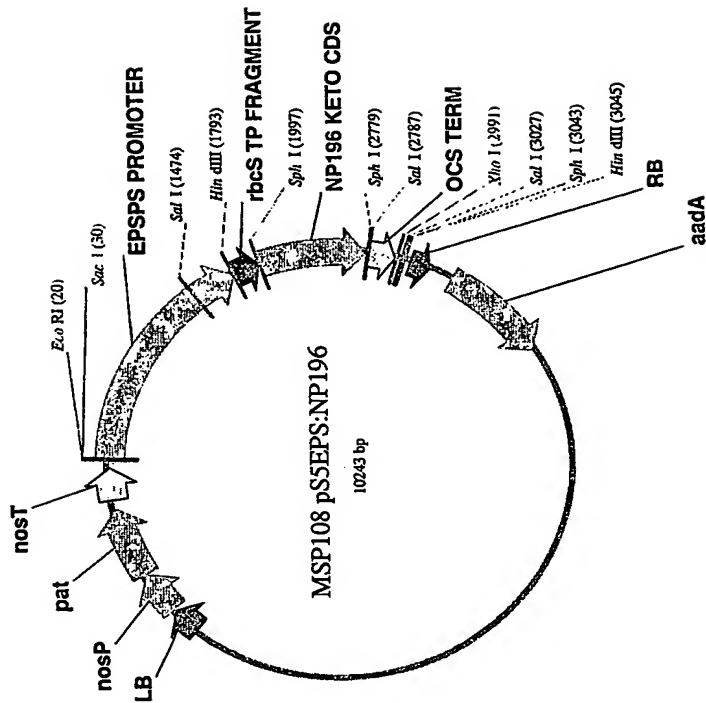




Abbildung 26: pSUN3 konstrukt zur Überexpression des  $\beta$ -C-4-Oxygenase Protein NP195 aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 mit rbcS Transsitpeptid aus Erbsen unter Kontrolle des FNR-Promoters

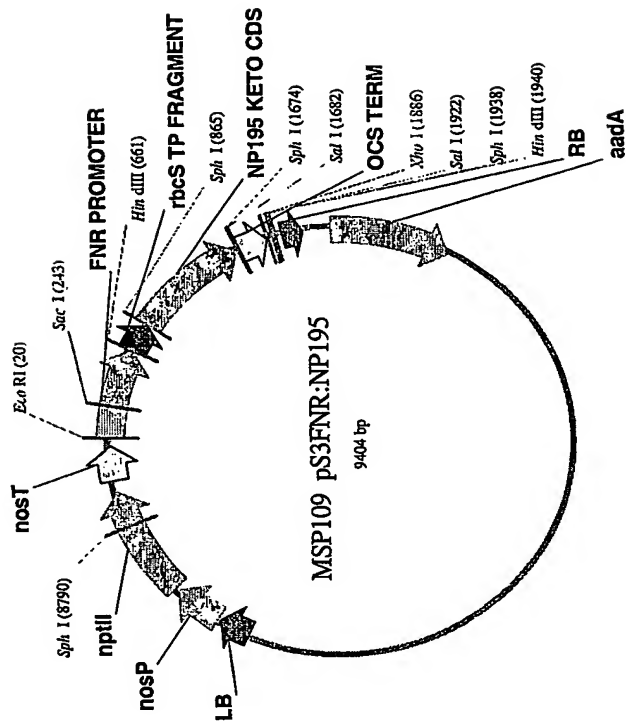


Abbildung 27: pSUN5 konstrukt zur Überexpression des  $\beta$ -C-4-Oxygenase Protein NP195 aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 mit rbcS Transsitpeptid aus Erbsen unter Kontrolle des FNR-Promoters

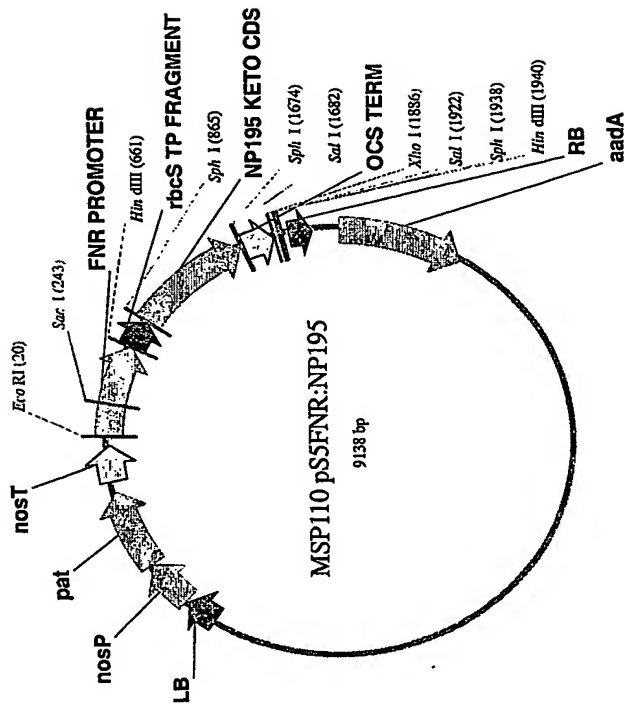
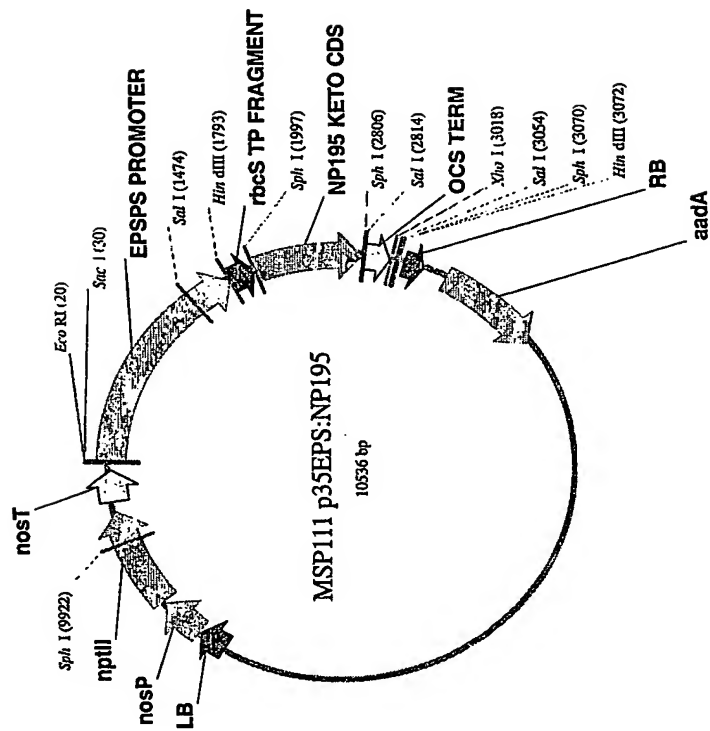


Abbildung 28: pSUN3 konstrukt zur Überexpression des  $\beta$ -C-4-Oxygenase Protein NP195 aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 mit rbcS Transitpeptid aus Erbsen unter Kontrolle des EPSPS-Promoters



32/47

Abbildung 29: pSUN5 konstrukt zur Überexpression des  $\beta$ -C-4-Oxygenase Protein NP195 aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 mit rbcS Transitpeptid aus Erbsen unter Kontrolle des EPSPS-Promoters

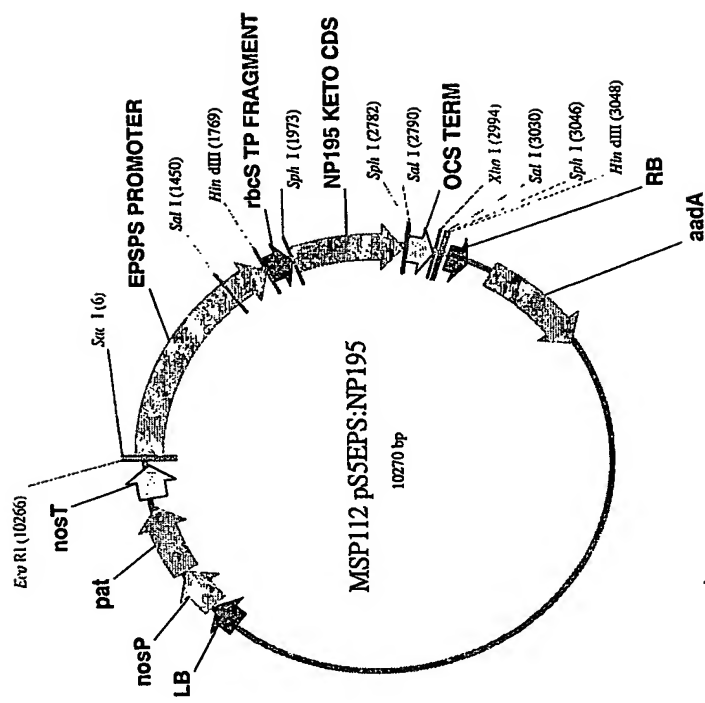


Abbildung 30: pSUN3 konstrukt zur Überexpression des  $\beta$ -C-4-Oxygenase Protein aus *Nodularia spumignea* NSOR10 mit rbcS Transitpeptid aus Erbse unter Kontrolle des FNR-Promoters

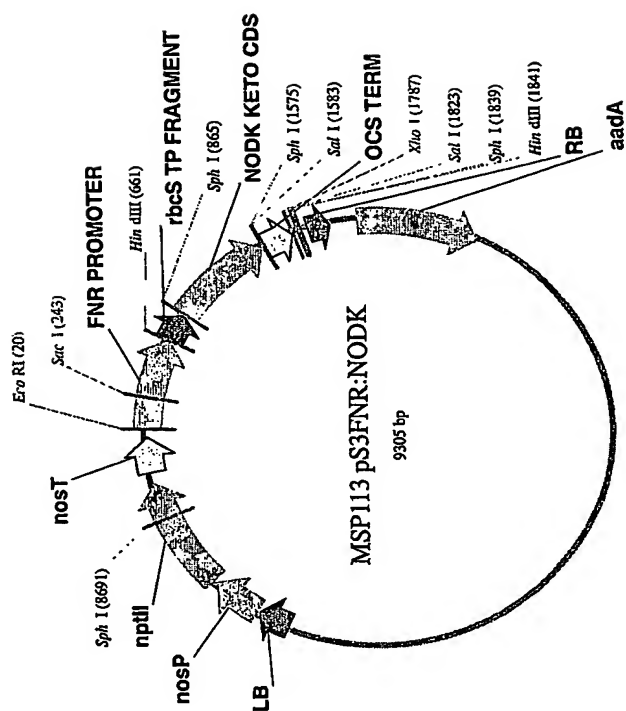


Abbildung 31: pSUN5 konstrukt zur Überexpression des  $\beta$ -C-4-Oxygenase Protein aus *Nodularia spumignea* NSOR10 mit rbcS Transitpeptid aus Erbse unter Kontrolle des FNR-Promoters

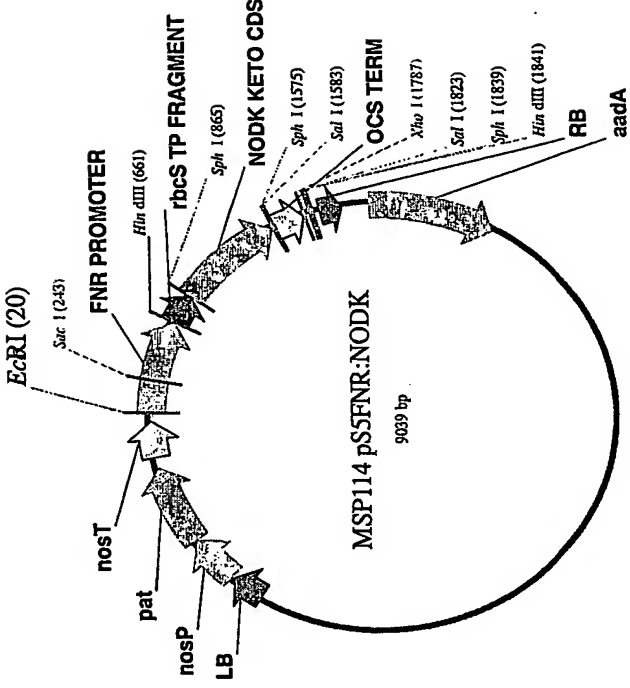


Abbildung 32: pSUN3 konstrukt zur Überexpression des  $\beta$ -C-4-Oxygenase Protein aus *Modularia spumignea* NSOR10 mit rbcS Transitpeptid aus Erbse unter Kontrolle des EPSPS-Promoters

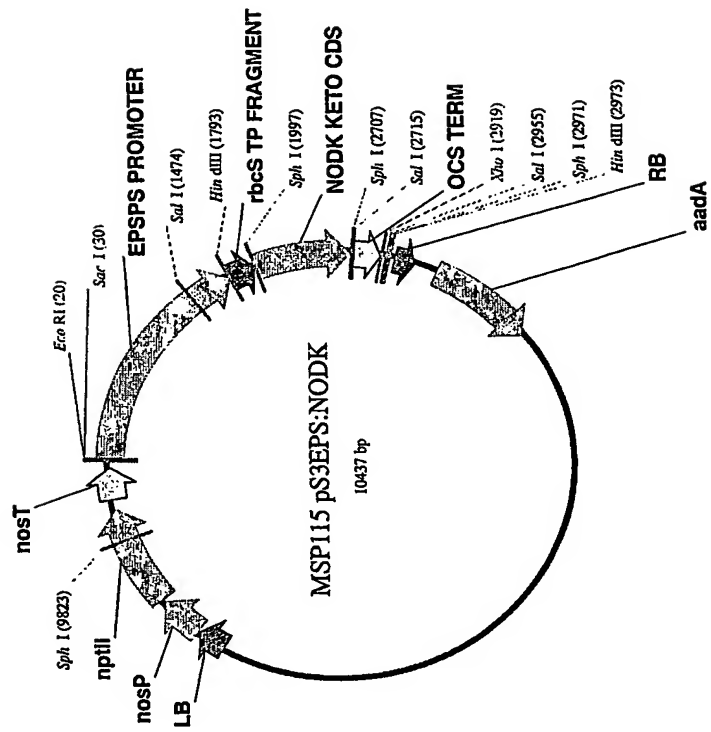
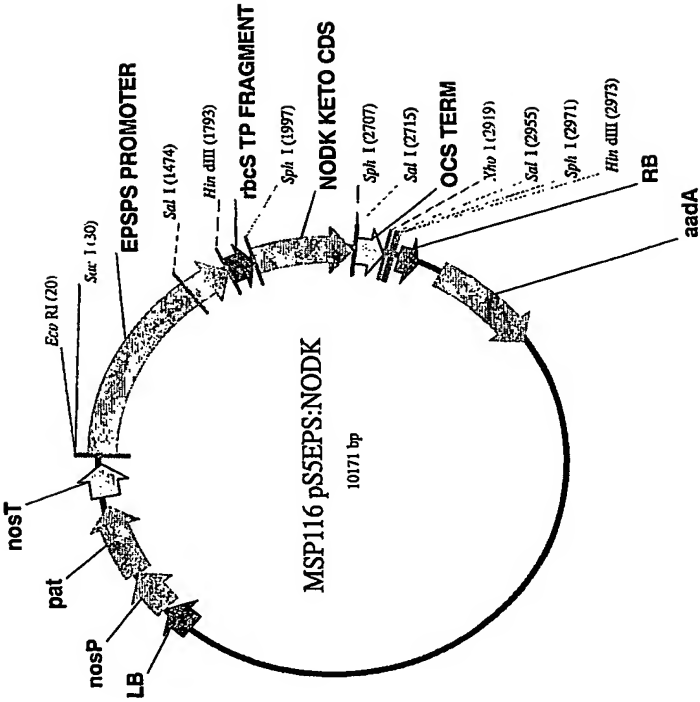


Abbildung 33: pSUN5 konstrukt zur Überexpression des  $\beta$ -C-4-Oxygenase Protein aus *Nodularia spumignea* NSOR10 mit rbcS Transitpeptid aus Erbse unter Kontrolle des EPSPS-Promoters





37/47

Abbildung 34: pSUN5 Konstrukt zur Überexpression des  $\beta$ -C-4-Oxygenase Proteins aus *Nodularia spumignea* NSOR10 sowie Runterregulierung der endogenen Tagetes Epsilon-Cyclase in *Tagetes erecta*.

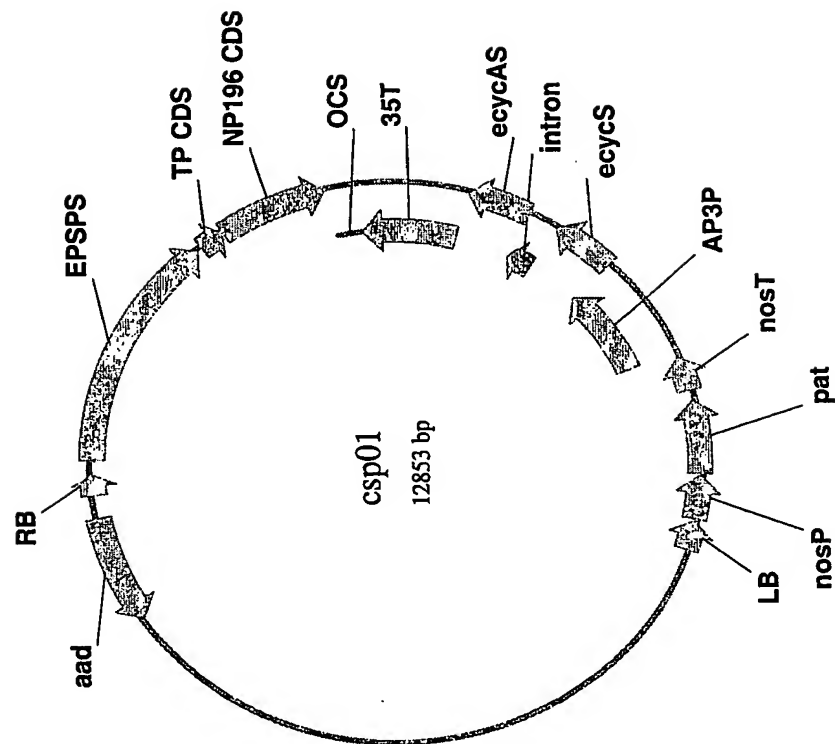
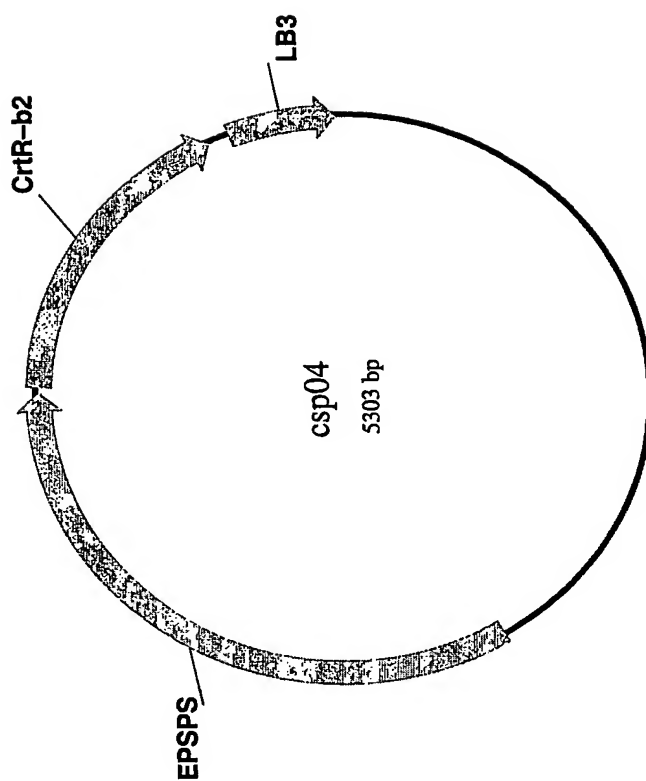


Abbildung 35: Expressionskassette zur Ueberexpression der b-Hydroxylase aus Tomate  
unter Kontrolle des EPSPS-Promoters



39/47

Abbildung 36: Expressionskassette zur Runterregulierung der endogenen b-Hydroxylase aus Tagetes unter Kontrolle des EPSPS-Promoters

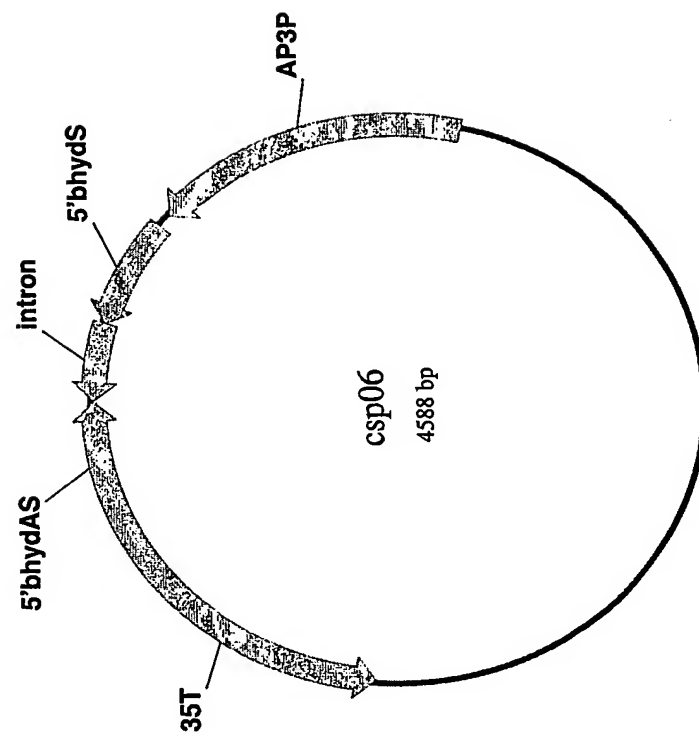


Abbildung 37: pSUN5 Konstrukt zur Runterregulierung der endogenen Tagetes-Ecycylase sowie Ueberexpression der NP196 Ketolase und der Tomaten-b-Hydroxylase

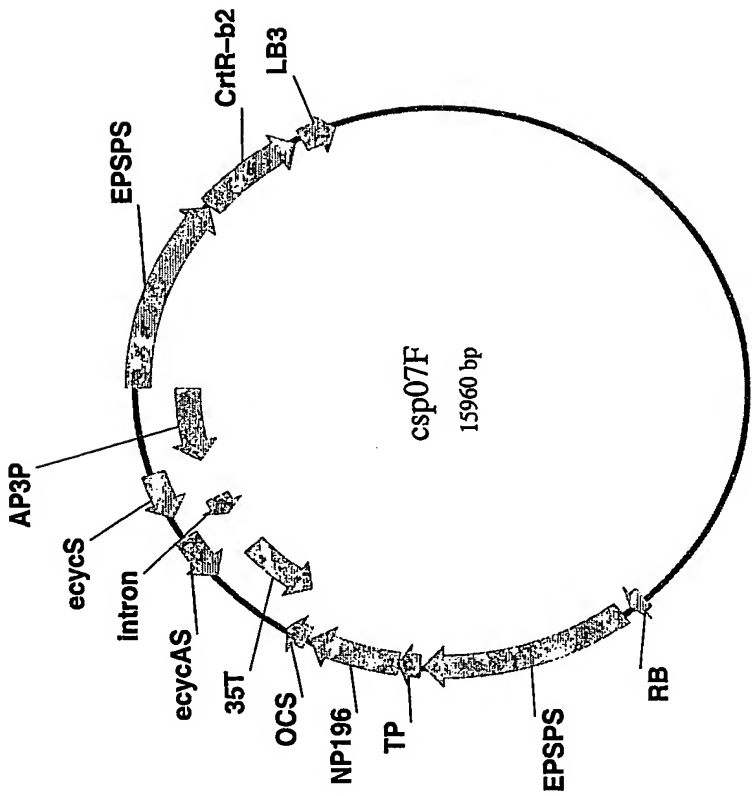


Abbildung 38: pSUN5 Konstrukt zur zur Runterregulierung der endogenen Tagetes-Ecycylase und Runterregulierung der endogenen Tagetes-b-Hydroxylase sowie Ueberexpression der NP196 Ketolase und der Tomaten-b-Hydroxylase

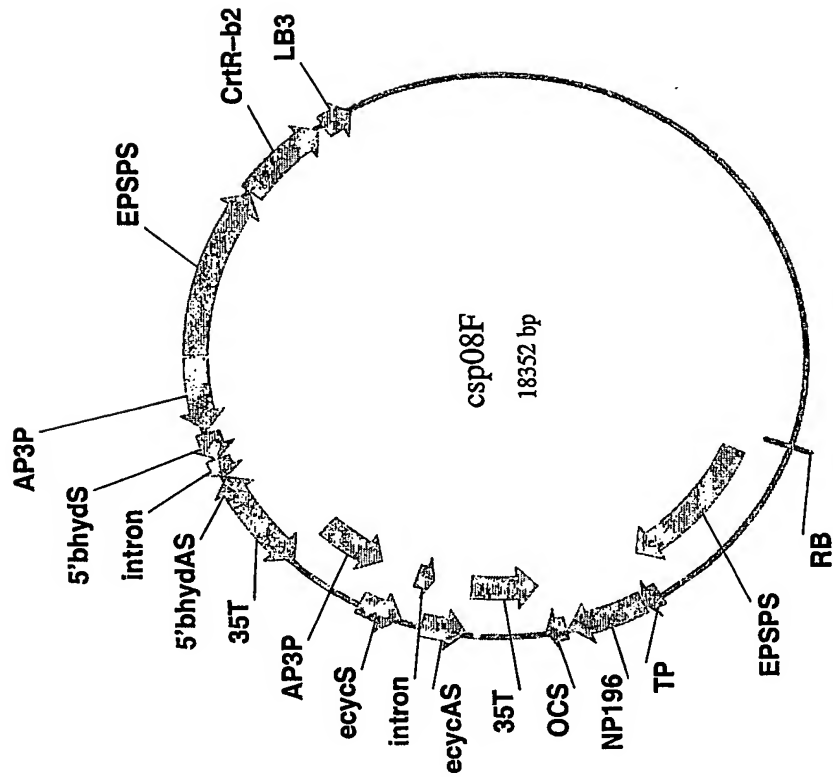


Abbildung 39: pSUN5 Konstrukt zur Runterregulierung der endogenen Tagetes-Ecyclyase und Runterregulierung der endogenen Tagetes-b-Hydroxylase sowie Ueberexpression der NP196 Ketolase und der Tomaten-b-Hydroxylase und des B-Genes aus Tomate

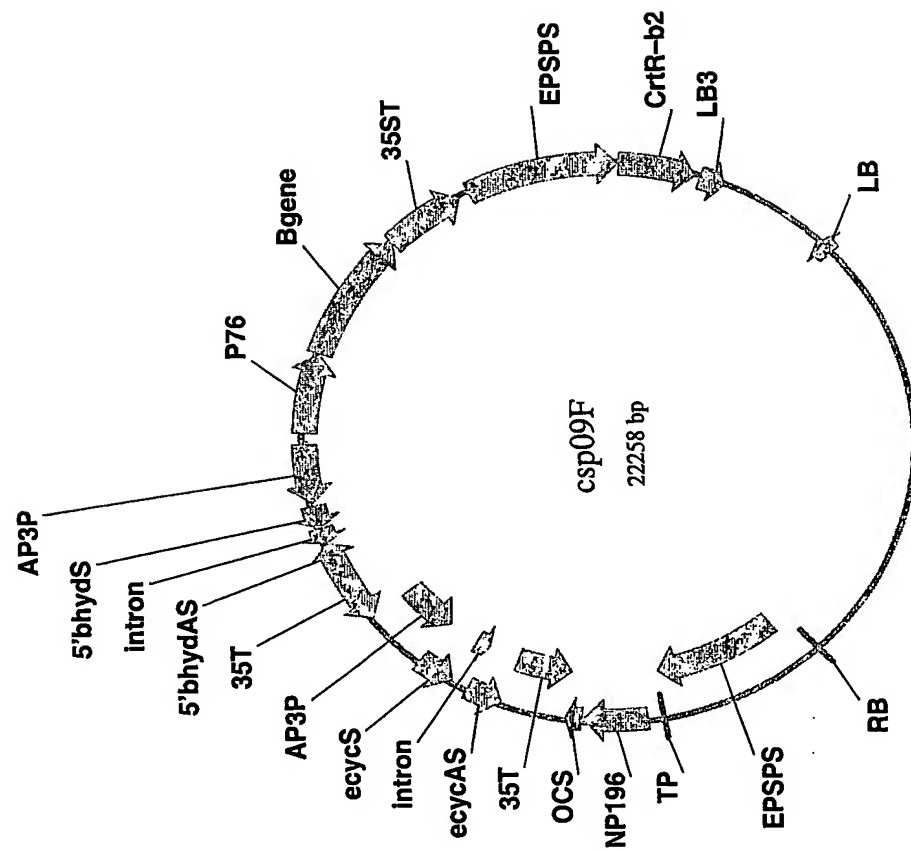


Abbildung 40: pSUN5 Konstrukt Ueberexpression der NP196 Ketolase  
und der Tomaten-b-Hydroxylase

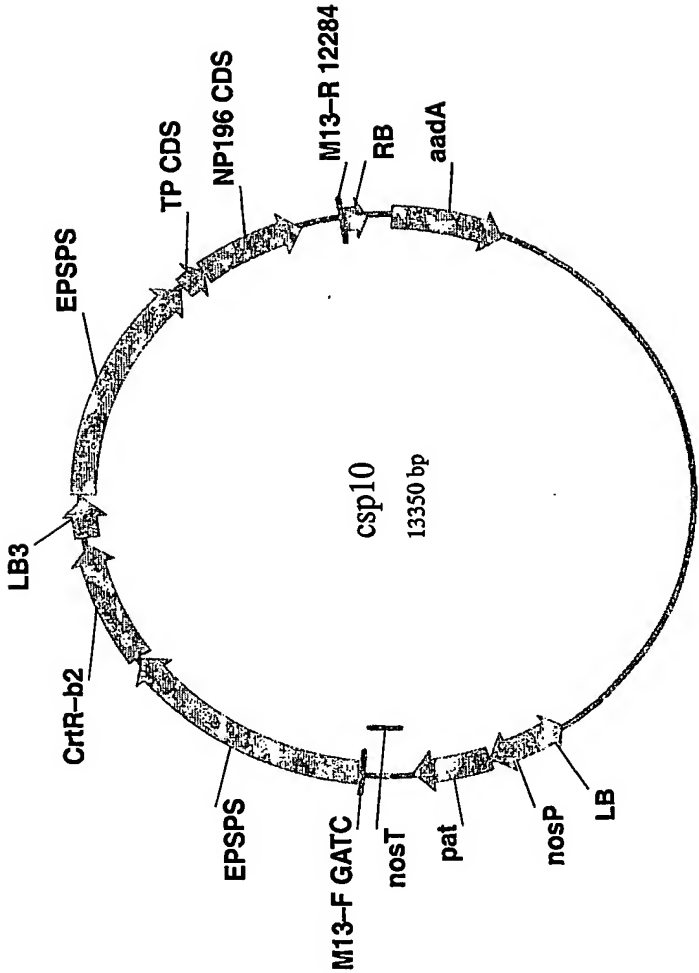


Abbildung 41: pSUN5 Konstrukt zur Runterregulierung der endogenen Tagetes-b-Hydroxylase sowie Ueberexpression der NP196 Ketolase und der Tomaten-b-Hydroxylase

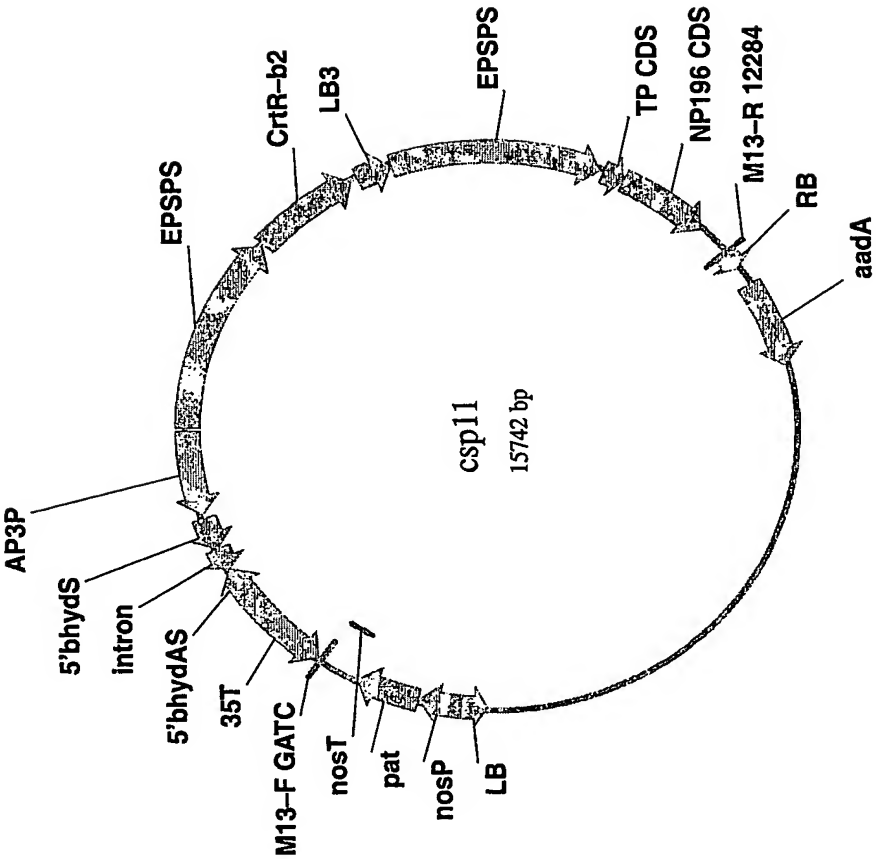
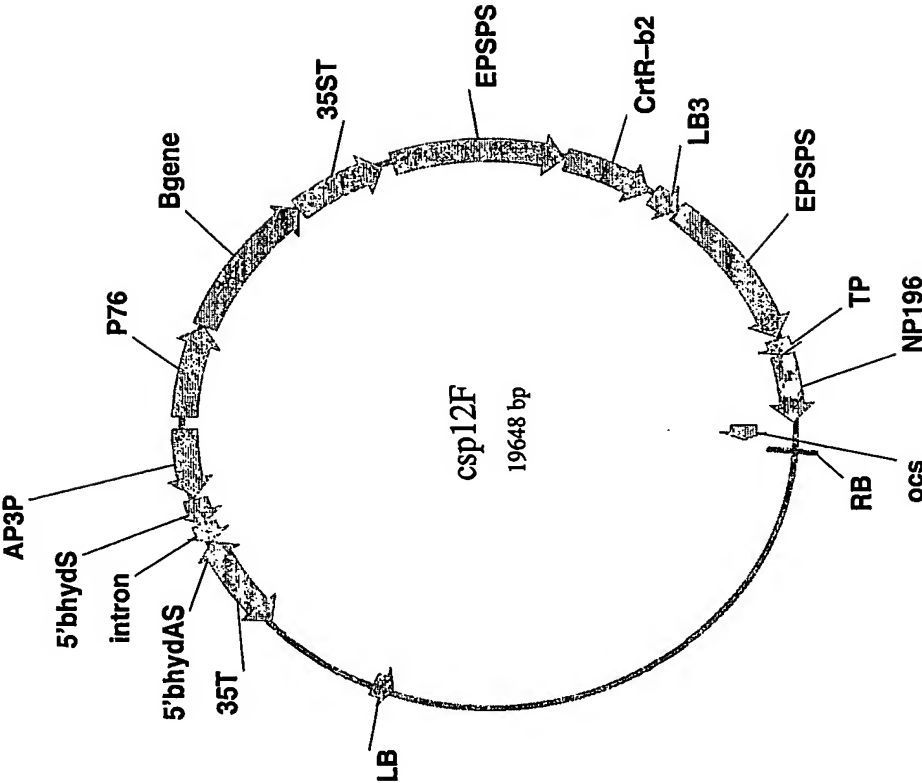




Abbildung 42: pSUN5 Konstrukt zur Runterregulierung der endogenen Tagetes-b-Hydroxylase sowie Ueberexpression der NP196 Ketolase, des B-Genes und der Tomaten-b-Hydroxylase



46/47

Abbildung 43: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Expression der chromoplastenspezifischen Lycopin beta cyclase aus *Lycopersicon esculentum* unter Kontrolle des Promoters P76 und zur blütenspezifischen Expression der Ketolase NP196 aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 unter Kontrolle des EPSPS Promoters

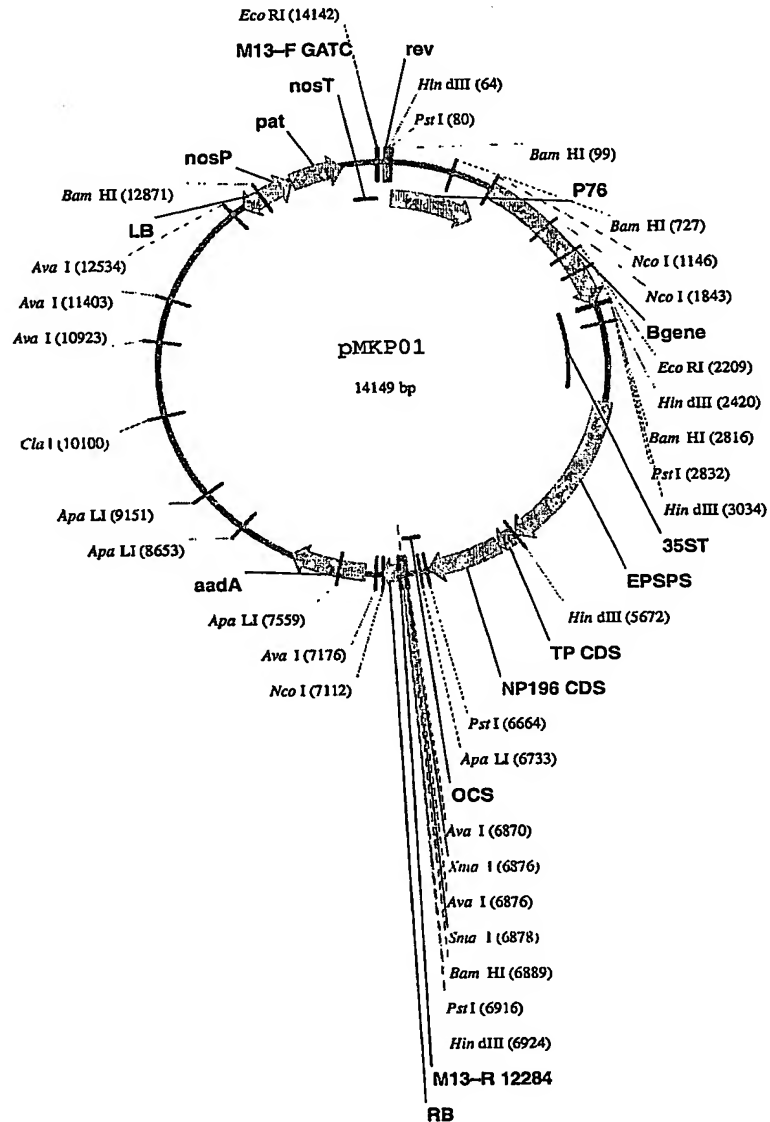
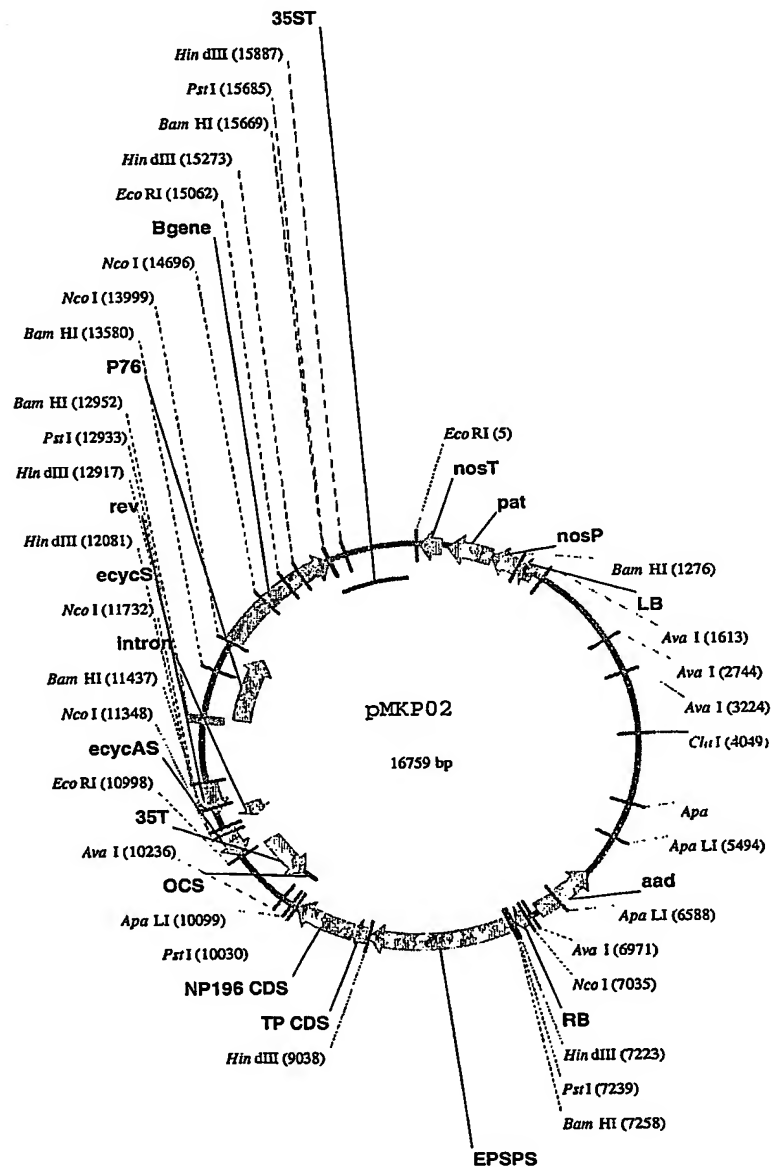


Abbildung 44: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Expression der chromoplastenspezifischen Lycopin beta cyclase aus *Lycoopersicon esculentum* unter Kontrolle des Promoters P76, zur blütenspezifischen Expression der Ketolase NP196 aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 unter Kontrolle des EPSPS Promoters und zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend 5'terminale Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA (AF251016) unter Kontrolle des AP3P-Promoters



## SEQUENCE LISTING

5 <110> SunGene GmbH Co. KGaA

10 <120> Verfahren zur Herstellung von Astaxanthin in Blueten von Pflanzen

<130> PF 53862

15 <160> 172

20 <170> PatentIn version 3.1

25 <210> 1

<211> 1771

<212> DNA

30 <213> Haematococcus pluvialis

35 <220>

<221> CDS

<222> (166)..(1155)

40 <223>

45 <400> 1

ggcacgagct tgcacgcaag tcagcgcgcg caagtcaaca cctgccggtc cacagcctca 60

aataataaag agctcaagcg tttgtgcgcc tcgacgtggc cagtctgcac tgccttgaac 120

50 ccgcgagtct cccgccgcac tgactgccat agcacagcta gacga atg cag cta gca 177

Met Gln Leu Ala

1

5	gcg aca gta atg ttg gag cag ctt acc gga agc gct gag gca ctc aag Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala Glu Ala Leu Lys 5 10 15 20	225
10	gag aag gag aag gag gtt gca ggc agc tct gac gtg ttg cgt aca tgg Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val Leu Arg Thr Trp 25 30 35	273
15	gcg acc cag tac tcg ctt ccg tca gaa gag tca gac gcg gcc cgc ccg Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp Ala Ala Arg Pro 40 45 50	321
20	gga ctg aag aat gcc tac aag cca cca cct tcc gac aca aag ggc atc Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp Thr Lys Gly Ile 55 60 65	369
25	aca atg gcg cta cgt gtc atc ggc tcc tgg gcc gca gtg ttc ctc cac Thr Met Ala Leu Arg Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala Val Phe Leu His 70 75 80	417
30	gcc att ttt caa atc aag ctt ccg acc tcc ttg gac cag ctg cac tgg Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp Gln Leu His Trp 85 90 95 100	465
35	ctg ccc gtg tca gat gcc aca gct cag ctg gtt agc ggc acg agc agc Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser Gly Thr Ser Ser 105 110 115	513
40	ctg ctc gac atc gtc gta gta ttc ttt gtc ctg gag ttc ctg tac aca Leu Leu Asp Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr 120 125 130	561
45	ggc ctt ttt atc acc acg cat gat gct atg cat ggc acc atc gcc atg Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly Thr Ile Ala Met 135 140 145	609
50	aga aac agg cag ctt aat gac ttc ttg ggc aga gta tgc atc tcc ttg Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val Cys Ile Ser Leu 150 155 160	657
55	tac gcc tgg ttt gat tac aac atg ctg cac cgc aag cat tgg gag cac Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys His Trp Glu His 165 170 175 180	705
60	cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag gac cct gac ttc cac agg gga His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp Phe His Arg Gly 185 190 195	753

	aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc agc ttc atg tcc agc tac atg	801
	Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met	
	200 205 210	
5	tcg atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca tgg tgg acg gtg gtc atg cag	849
	Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr Val Val Met Gln	
	215 220 225	
10	ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg ctg gtg ttc atg gcg gcc gcg	897
	Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala	
	230 235 240	
	ccc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc tac ttt ggc acg tac atg ccc	945
15	Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Met Pro	
	245 250 255 260	
	cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca ggc tct tca cca gcc gtc atg	993
	His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser Pro Ala Val Met	
20	265 270 275	
	aac tgg tgg aag tcg cgc act agc cag gcg tcc gac ctg gtc agc ttt	1041
	Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp Leu Val Ser Phe	
	280 285 290	
25	ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac tgg gag cac cac cgc tgg ccc	1089
	Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His His Arg Trp Pro	
	295 300 305	
30	ttc gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc cgc ctg tct ggc cga	1137
	Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg	
	310 315 320	
	ggg ctg gtt cct gcc tag ctggacacac tgcagtgggc cctgctgcc	1185
35	Gly Leu Val Pro Ala	
	325	
	gctgggcatg caggttgtgg caggactggg tgaggtgaaa agctgcaggc gctgctgccg	1245
40	gacacgctgc atgggctacc ctgtgtagct gccgccacta ggggaggggg tttgtagctg	1305
	tcgagcttgc cccatggatg aagctgtgta gtggtgcagg gagtacaccc acaggccaac	1365
	acccttgcag gagatgtctt gcgtcgggag gagtggtggg cagtgtagat gctatgattg	1425
45	tatcttaatg ctgaagcctt taggggagcg aacttagtg ctgggcaggc aacgccctgc	1485
	aaggtgcagg cacaagctag gctggacgag gactcgggtg caggcagggtg aagaggtgcg	1545
50	ggaggggtggt gccacaccca ctgggcaaga ccatgctgca atgctggcgg tgtggcagtg	1605

agagctgcgt gattaactgg gctatggatt gtttgagcag tctcacttat tctttgatat 1665  
 agatactggg caggcagggtc aggagagtga gtatgaacaa gttgagaggt ggtgcgctgc 1725  
 5 ccctgcgctt atgaagctgt aacaataaag tgggtcaaaa aaaaaa 1771  
  
 <210> 2  
 10 <211> 329  
 <212> PRT  
 15 <213> Haematococcus pluvialis  
  
 <400> 2  
 20 Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala  
 1 5 10 15  
 25 Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val  
 20 25 30  
 30 Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp  
 35 40 45  
 35 Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp  
 50 55 60  
 Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Arg Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala  
 65 70 75 80  
 40 Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp  
 85 90 95  
 45 Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser  
 100 105 110  
 50 Gly Thr Ser Ser Leu Leu Asp Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu  
 115 120 125

Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly  
 130 135 140  
 5

Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val  
 145 150 155 160

10  
 Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys  
 165 170 175

15 His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp  
 180 185 190

20 Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met  
 195 200 205

Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr  
 210 215 220  
 25

Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe  
 225 230 235 240

30  
 Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly  
 245 250 255

35 Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser  
 260 265 270

Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp  
 275 280 285  
 40

Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His  
 290 295 300  
 45

His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg  
 305 310 315 320  
 50



Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala  
325

5 <210> 3  
 <211> 1662  
 <212> DNA  
 10 <213> Haematococcus pluvialis

15 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (168) .. (1130)  
 20 <223>

25 <400> 3  
 cgggggcaact caagaaattc aacagctgca agcgcgcccc agcctcacag cgccaagtga 60  
 gctatcgacg tgggtgtgag cgctcgacgt ggtccactga cgggcctgtg agcctctgcg 120  
 30 ctccgtcctc tgccaaatct cgcgtcgggg cctgcctaag tcgaaga atg cac gtc 176  
 Met His Val  
 1

35 gca tcg gca cta atg gtc gag cag aaa ggc agt gag gca gct gct tcc 224  
 Ala Ser Ala Leu Met Val Glu Gln Lys Gly Ser Glu Ala Ala Ala Ser  
 5 10 15

40 agc cca gac gtc ttg aga gcg tgg gcg aca cag tat cac atg cca tcc 272  
 Ser Pro Asp Val Leu Arg Ala Trp Ala Thr Gln Tyr His Met Pro Ser  
 20 25 30 35

45 gag tcg tca gac gca gct cgt cct gcg cta aag cac gcc tac aaa cct 320  
 Glu Ser Ser Asp Ala Ala Arg Pro Ala Leu Lys His Ala Tyr Lys Pro  
 40 45 50

cca gca tct gac gcc aag ggc atc acg atg gcg ctg acc atc att ggc 368  
 Pro Ala Ser Asp Ala Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Thr Ile Ile Gly  
 55 60 65

50 acc tgg acc gca gtg ttt tta cac gca ata ttt caa atc agg cta ccg 416

## 7

	Thr	Trp	Thr	Ala	Val	Phe	Leu	His	Ala	Ile	Phe	Gln	Ile	Arg	Leu	Pro	
			70					75					80				
5	aca	tcc	atg	gac	cag	ctt	cac	tgg	ttg	cct	gtg	tcc	gaa	gcc	aca	gcc	464
	Thr	Ser	Met	Asp	Gln	Leu	His	Trp	Leu	Pro	Val	Ser	Glu	Ala	Thr	Ala	
		85					90					95					
10	cag	ctt	ttg	ggc	gga	agc	agc	agc	cta	ctg	cac	atc	gct	gca	gtc	ttc	512
	Gln	Leu	Leu	Gly	Gly	Ser	Ser	Ser	Leu	Leu	His	Ile	Ala	Ala	Val	Phe	
	100					105					110					115	
15	att	gta	ctt	gag	ttc	ctg	tac	act	ggc	cta	ttc	atc	acc	aca	cat	gac	560
	Ile	Val	Leu	Glu	Phe	Leu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Phe	Ile	Thr	Thr	His	Asp	
					120					125					130		
	gca	atg	cat	ggc	acc	ata	gct	ttg	agg	cac	agg	cag	ctc	aat	gat	ctc	608
	Ala	Met	His	Gly	Thr	Ile	Ala	Leu	Arg	His	Arg	Gln	Leu	Asn	Asp	Leu	
				135					140					145			
20	ctt	ggc	aac	atc	tgc	ata	tca	ctg	tac	gcc	tgg	ttt	gac	tac	agc	atg	656
	Leu	Gly	Asn	Ile	Cys	Ile	Ser	Leu	Tyr	Ala	Trp	Phe	Asp	Tyr	Ser	Met	
			150					155					160				
25	ctg	cat	cgc	aag	cac	tgg	gag	cac	cac	aac	cat	act	ggc	gaa	gtg	ggg	704
	Leu	His	Arg	Lys	His	Trp	Glu	His	His	Asn	His	Thr	Gly	Glu	Val	Gly	
		165					170					175					
30	aaa	gac	cct	gac	ttc	cac	aag	gga	aat	ccc	ggc	ctt	gtc	ccc	tgg	ttc	752
	Lys	Asp	Pro	Asp	Phe	His	Lys	Gly	Asn	Pro	Gly	Leu	Val	Pro	Trp	Phe	
	180					185					190					195	
35	gcc	agc	ttc	atg	tcc	agc	tac	atg	tcc	ctg	tgg	cag	ttt	gcc	cgg	ctg	800
	Ala	Ser	Phe	Met	Ser	Ser	Tyr	Met	Ser	Leu	Trp	Gln	Phe	Ala	Arg	Leu	
					200					205				210			
	gca	tgg	tgg	gca	gtg	gtg	atg	caa	atg	ctg	ggg	gcg	ccc	atg	gca	aat	848
	Ala	Trp	Trp	Ala	Val	Val	Met	Gln	Met	Leu	Gly	Ala	Pro	Met	Ala	Asn	
				215				220					225				
40	ctc	cta	gtc	ttc	atg	gct	gca	gcc	cca	atc	ttg	tca	gca	ttc	cgc	ctc	896
	Leu	Leu	Val	Phe	Met	Ala	Ala	Ala	Pro	Ile	Leu	Ser	Ala	Phe	Arg	Leu	
			230					235					240				
45	ttc	tac	ttc	ggc	act	tac	ctg	cca	cac	aag	cct	gag	cca	ggc	cct	gca	944
	Phe	Tyr	Phe	Gly	Thr	Tyr	Leu	Pro	His	Lys	Pro	Glu	Pro	Gly	Pro	Ala	
		245					250					255					
50	gca	ggc	tct	cag	gtg	atg	gcc	tgg	ttc	agg	gcc	aag	aca	agt	gag	gca	992
	Ala	Gly	Ser	Gln	Val	Met	Ala	Trp	Phe	Arg	Ala	Lys	Thr	Ser	Glu	Ala	
	260					265				270						275	

tct gat gtg atg agt ttc ctg aca tgc tac cac ttt gac ctg cac tgg 1040  
 Ser Asp Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp  
 280 285 290

5 gag cac cac agg tgg ccc ttt gcc ccc tgg tgg cag ctg ccc cac tgc 1088  
 Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Gln Leu Pro His Cys  
 295 300 305

10 cgc cgc ctg tcc ggg cgt ggc ctg gtg cct gcc ttg gca tga 1130  
 Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Leu Ala  
 310 315 320

15 cctgggtccct ccgctggtga cccagcgtct gcacaagagt gtcattgctac aggggtgctgc 1190  
 ggccagtggtc agcgagtggtc actctcagcc tgtatggggc taccgctgtg ccaactgagca 1250  
 ctgggcatgc cactgagcac tgggcgtgct actgagcaat gggcgtgcta ctgagcaatg 1310

20 ggcgtgctac tgacaatggg cgtgctactg gggctctggca gtggctagga tggagtttga 1370  
 tgcattcagt agcgggtggc aacgtcatgt ggatgggtgga agtgctgagg ggtttaggca 1430

25 gccggcattt gagagggcta agttataaat cgcattgctgc tcatgcgcac atatctgcac 1490  
 acagccaggg aaatcccttc gagagtgatt atgggacact tgtattggtt tcgtgctatt 1550  
 gttttattca gcagcagtag ttagtgaggg tgagagcagg gtggtgagag tggagtgagt 1610

30 gagtatgaac ctggtcagcg aggtgaacag cctgtaatga atgactctgt ct 1662

<210> 4

35 <211> 320

<212> PRT

40 <213> Haematococcus pluvialis

<400> 4

45 Met His Val Ala Ser Ala Leu Met Val Glu Gln Lys Gly Ser Glu Ala  
 1 5 10 15

50 Ala Ala Ser Ser Pro Asp Val Leu Arg Ala Trp Ala Thr Gln Tyr His  
 20 25 30

Met Pro Ser Glu Ser Ser Asp Ala Ala Arg Pro Ala Leu Lys His Ala  
 35 40 45  
 5

Tyr Lys Pro Pro Ala Ser Asp Ala Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Thr  
 50 55 60  
 10

Ile Ile Gly Thr Trp Thr Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile  
 65 70 75 80  
 15

Arg Leu Pro Thr Ser Met Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Glu  
 85 90 95  
 20

Ala Thr Ala Gln Leu Leu Gly Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Ala  
 100 105 110  
 25

Ala Val Phe Ile Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr  
 115 120 125  
 30

Thr His Asp Ala Met His Gly Thr Ile Ala Leu Arg His Arg Gln Leu  
 130 135 140  
 35

Asn Asp Leu Leu Gly Asn Ile Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp  
 145 150 155 160  
 40

Tyr Ser Met Leu His Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly  
 165 170 175  
 45

Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp Phe His Lys Gly Asn Pro Gly Leu Val  
 180 185 190  
 50

Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Leu Trp Gln Phe  
 195 200 205  
 50

Ala Arg Leu Ala Trp Trp Ala Val Val Met Gln Met Leu Gly Ala Pro  
 210 215 220

## 10

Met Ala Asn Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala  
 225 230 235 240

5 Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Glu Pro  
 245 250 255

10 Gly Pro Ala Ala Gly Ser Gln Val Met Ala Trp Phe Arg Ala Lys Thr  
 260 265 270

15 Ser Glu Ala Ser Asp Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp  
 275 280 285

20 Leu His Trp Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Gln Leu  
 290 295 300

Pro His Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Leu Ala  
 305 310 315 320

25 <210> 5

<211> 729

<212> DNA

30 <213> Agrobacterium aurantiacum

35 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(729)

40 <223>

45 <400> 5

atg agc gca cat gcc ctg ccc aag gca gat ctg acc gcc acc agc ctg 48  
 Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu  
 1 5 10 15

50 atc gtc tcg ggc ggc atc atc gcc gct tgg ctg gcc ctg cat gtg cat 96

## 11

	Ile	Val	Ser	Gly	Gly	Ile	Ile	Ala	Ala	Trp	Leu	Ala	Leu	His	Val	His	
				20					25					30			
5	gcg	ctg	tgg	ttt	ctg	gac	gca	gcg	gcg	cat	ccc	atc	ctg	gcg	atc	gca	144
	Ala	Leu	Trp	Phe	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	His	Pro	Ile	Leu	Ala	Ile	Ala	
			35					40					45				
10	aat	ttc	ctg	ggg	ctg	acc	tgg	ctg	tcg	gtc	gga	ttg	ttc	atc	atc	gcg	192
	Asn	Phe	Leu	Gly	Leu	Thr	Trp	Leu	Ser	Val	Gly	Leu	Phe	Ile	Ile	Ala	
		50					55				60						
15	cat	gac	gcg	atg	cac	ggg	tcg	gtg	gtg	ccg	ggg	cgt	ccg	cgc	gcc	aat	240
	His	Asp	Ala	Met	His	Gly	Ser	Val	Val	Pro	Gly	Arg	Pro	Arg	Ala	Asn	
	65					70					75				80		
	gcg	gcg	atg	ggc	cag	ctt	gtc	ctg	tgg	ctg	tat	gcc	gga	ttt	tcg	tgg	288
	Ala	Ala	Met	Gly	Gln	Leu	Val	Leu	Trp	Leu	Tyr	Ala	Gly	Phe	Ser	Trp	
					85				90					95			
20	cgc	aag	atg	atc	gtc	aag	cac	atg	gcc	cat	cac	cgc	cat	gcc	gga	acc	336
	Arg	Lys	Met	Ile	Val	Lys	His	Met	Ala	His	His	Arg	His	Ala	Gly	Thr	
				100				105					110				
25	gac	gac	gac	ccc	gat	ttc	gac	cat	ggc	ggc	ccg	gtc	cgc	tgg	tac	gcc	384
	Asp	Asp	Asp	Pro	Asp	Phe	Asp	His	Gly	Gly	Pro	Val	Arg	Trp	Tyr	Ala	
			115					120					125				
30	cgc	ttc	atc	ggc	acc	tat	ttc	ggc	tgg	cgc	gag	ggg	ctg	ctg	ctg	ccc	432
	Arg	Phe	Ile	Gly	Thr	Tyr	Phe	Gly	Trp	Arg	Glu	Gly	Leu	Leu	Leu	Pro	
		130					135					140					
35	gtc	atc	gtg	acg	gtc	tat	gcg	ctg	atc	ctt	ggg	gat	cgc	tgg	atg	tac	480
	Val	Ile	Val	Thr	Val	Tyr	Ala	Leu	Ile	Leu	Gly	Asp	Arg	Trp	Met	Tyr	
	145				150					155				160			
	gtg	gtc	ttc	tgg	ccg	ctg	ccg	tcg	atc	ctg	gcg	tcg	atc	cag	ctg	ttc	528
	Val	Val	Phe	Trp	Pro	Leu	Pro	Ser	Ile	Leu	Ala	Ser	Ile	Gln	Leu	Phe	
					165				170					175			
40	gtg	ttc	ggc	acc	tgg	ctg	ccg	cac	cgc	ccc	ggc	cac	gac	gcg	ttc	ccg	576
	Val	Phe	Gly	Thr	Trp	Leu	Pro	His	Arg	Pro	Gly	His	Asp	Ala	Phe	Pro	
				180				185					190				
45	gac	cgc	cac	aat	gcg	cgg	tcg	tcg	cgg	atc	agc	gac	ccc	gtg	tcg	ctg	624
	Asp	Arg	His	Asn	Ala	Arg	Ser	Ser	Arg	Ile	Ser	Asp	Pro	Val	Ser	Leu	
			195					200				205					
50	ctg	acc	tgc	ttt	cac	ttt	ggc	ggg	tat	cat	cac	gaa	cac	cac	ctg	cac	672
	Leu	Thr	Cys	Phe	His	Phe	Gly	Gly	Tyr	His	His	Glu	His	His	Leu	His	
		210					215					220					

## 12

ccg acg gtg ccg tgg tgg cgc ctg ccc agc acc cgc acc aag ggg gac 720  
 Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp  
 225 230 235 240  
 5 acc gca tga 729  
 Thr Ala  
 10  
 <210> 6  
 <211> 242  
 15 <212> PRT  
 <213> Agrobacterium aurantiacum  
 20  
 <400> 6  
 Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu  
 1 5 10 15  
 25  
 Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His  
 20 25 30  
 30  
 Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Ile Ala  
 35 40 45  
 35 Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala  
 50 55 60  
 40 His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn  
 65 70 75 80  
 Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp  
 85 90 95  
 45  
 Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr  
 100 105 110  
 50

## 13

Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala  
 115 120 125

5 Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro  
 130 135 140

10 Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr  
 145 150 155 160

15 Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe  
 165 170 175

Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro  
 180 185 190

20 Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu  
 195 200 205

25 Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His  
 210 215 220

30 Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp  
 225 230 235 240

Thr Ala

35

<210> 7

<211> 1631

40 <212> DNA

<213> Alcaligenes sp.

45

<220>

<221> CDS

50



&lt;222&gt; (99) .. (827)

&lt;223&gt;

5

&lt;400&gt; 7

	ctgcaggccg ggcccgggtgg ccaatgggtcg caaccggcag gactggaaca ggacggcggg	60
10	ccgggtctagg ctgtcgccct acgcagcagg agtttcgg atg tcc gga cgg aag cct Met Ser Gly Arg Lys Pro 1 5	116
15	ggc aca act ggc gac acg atc gtc aat ctc ggt ctg acc gcc gcg atc Gly Thr Thr Gly Asp Thr Ile Val Asn Leu Gly Leu Thr Ala Ala Ile 10 15 20	164
20	ctg ctg tgc tgg ctg gtc ctg cac gcc ttt acg cta tgg ttg cta gat Leu Leu Cys Trp Leu Val Leu His Ala Phe Thr Leu Trp Leu Leu Asp 25 30 35	212
25	gcg gcc gcg cat ccg ctg ctt gcc gtg ctg tgc ctg gct ggg ctg acc Ala Ala Ala His Pro Leu Leu Ala Val Leu Cys Leu Ala Gly Leu Thr 40 45 50	260
30	tgg ctg tgc gtc ggg ctg ttc atc atc gcg cat gac gca atg cac ggg Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala His Asp Ala Met His Gly 55 60 65 70	308
35	tcc gtg gtg ccg ggg cgg ccg cgc gcc aat gcg gcg atc ggg caa ctg Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn Ala Ala Ile Gly Gln Leu 75 80 85	356
40	gcg ctg tgg ctc tat gcg ggg ttc tgc tgg ccc aag ctg atc gcc aag Ala Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp Pro Lys Leu Ile Ala Lys 90 95 100	404
45	cac atg acg cat cac cgg cac gcc ggc acc gac aac gat ccc gat ttc His Met Thr His His Arg His Ala Gly Thr Asp Asn Asp Pro Asp Phe 105 110 115	452
50	ggt cac gga ggg ccc gtg cgc tgg tac ggc agc ttc gtc tcc acc tat Gly His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Gly Ser Phe Val Ser Thr Tyr 120 125 130	500
	ttc ggc tgg cga gag gga ctg ctg cta ccg gtg atc gtc acc acc tat Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro Val Ile Val Thr Thr Tyr 135 140 145 150	548
	gcg ctg atc ctg ggc gat cgc tgg atg tat gtc atc ttc tgg ccg gtc	596

## 15

[illegible]

&lt;210&gt; 8

5 &lt;211&gt; 242

&lt;212&gt; PRT

10 &lt;213&gt; Alcaligenes sp.

&lt;400&gt; 8

15 Met Ser Gly Arg Lys Pro Gly Thr Thr Gly Asp Thr Ile Val Asn Leu  
 1 5 10 15

20 Gly Leu Thr Ala Ala Ile Leu Leu Cys Trp Leu Val Leu His Ala Phe  
 20 25 30

25 Thr Leu Trp Leu Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Leu Leu Ala Val Leu  
 35 40 45

Cys Leu Ala Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala  
 50 55 60

30 His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn  
 65 70 75 80

35 Ala Ala Ile Gly Gln Leu Ala Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp  
 85 90 95

40 Pro Lys Leu Ile Ala Lys His Met Thr His His Arg His Ala Gly Thr  
 100 105 110

45 Asp Asn Asp Pro Asp Phe Gly His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Gly  
 115 120 125

Ser Phe Val Ser Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro  
 130 135 140

50

## 17

Val Ile Val Thr Thr Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr  
 145 150 155 160

5 Val Ile Phe Trp Pro Val Pro Ala Val Leu Ala Ser Ile Gln Ile Phe  
 165 170 175

10 Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Asp Phe Pro  
 180 185 190

15 Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Thr Gly Ile Gly Asp Pro Leu Ser Leu  
 195 200 205

Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His  
 210 215 220

20 Pro His Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Arg Thr Arg Lys Thr Gly Gly  
 225 230 235 240

25 Arg Ala

30 <210> 9  
 <211> 729  
 <212> DNA

35 <213> *Paracoccus marcusii*

40 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(729)

45 <223>

50 <400> 9  
 atg agc gca cat gcc ctg ccc aag gca gat ctg acc gcc aca agc ctg

## 18

	Met	Ser	Ala	His	Ala	Leu	Pro	Lys	Ala	Asp	Leu	Thr	Ala	Thr	Ser	Leu	
	1				5					10					15		
	atc	gtc	tcg	ggc	ggc	atc	atc	gcc	gca	tgg	ctg	gcc	ctg	cat	gtg	cat	96
5	Ile	Val	Ser	Gly	Gly	Ile	Ile	Ala	Ala	Trp	Leu	Ala	Leu	His	Val	His	
				20					25					30			
	gcg	ctg	tgg	ttt	ctg	gac	gcg	gcg	gcc	cat	ccc	atc	ctg	gcg	gtc	gcg	144
10	Ala	Leu	Trp	Phe	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	His	Pro	Ile	Leu	Ala	Val	Ala	
			35					40					45				
	aat	ttc	ctg	ggg	ctg	acc	tgg	ctg	tcg	gtc	gga	ttg	ttc	atc	atc	gcg	192
	Asn	Phe	Leu	Gly	Leu	Thr	Trp	Leu	Ser	Val	Gly	Leu	Phe	Ile	Ile	Ala	
		50					55				60						
15	cat	gac	gcg	atg	cac	ggg	tcg	gtc	gtg	ccg	ggg	cgt	ccg	cgc	gcc	aat	240
	His	Asp	Ala	Met	His	Gly	Ser	Val	Val	Pro	Gly	Arg	Pro	Arg	Ala	Asn	
	65				70					75					80		
20	gcg	gcg	atg	ggc	cag	ctt	gtc	ctg	tgg	ctg	tat	gcc	gga	ttt	tcg	tgg	288
	Ala	Ala	Met	Gly	Gln	Leu	Val	Leu	Trp	Leu	Tyr	Ala	Gly	Phe	Ser	Trp	
					85				90					95			
	cgc	aag	atg	atc	gtc	aag	cac	atg	gcc	cat	cac	cgc	cat	gcc	gga	acc	336
25	Arg	Lys	Met	Ile	Val	Lys	His	Met	Ala	His	His	Arg	His	Ala	Gly	Thr	
				100				105						110			
	gac	gac	gac	cca	gat	ttc	gac	cat	ggc	ggc	ccg	gtc	cgc	tgg	tac	gcc	384
30	Asp	Asp	Asp	Pro	Asp	Phe	Asp	His	Gly	Gly	Pro	Val	Arg	Trp	Tyr	Ala	
			115					120					125				
	cgc	ttc	atc	ggc	acc	tat	ttc	ggc	tgg	cgc	gag	ggg	ctg	ctg	ctg	ccc	432
	Arg	Phe	Ile	Gly	Thr	Tyr	Phe	Gly	Trp	Arg	Glu	Gly	Leu	Leu	Leu	Pro	
		130					135				140						
35	gtc	atc	gtg	acg	gtc	tat	gcg	ctg	atc	ctg	ggg	gat	cgc	tgg	atg	tac	480
	Val	Ile	Val	Thr	Val	Tyr	Ala	Leu	Ile	Leu	Gly	Asp	Arg	Trp	Met	Tyr	
	145				150					155					160		
40	gtg	gtc	ttc	tgg	ccg	ttg	ccg	tcg	atc	ctg	gcg	tcg	atc	cag	ctg	ttc	528
	Val	Val	Phe	Trp	Pro	Leu	Pro	Ser	Ile	Leu	Ala	Ser	Ile	Gln	Leu	Phe	
					165					170				175			
	gtg	ttc	ggc	act	tgg	ctg	ccg	cac	cgc	ccc	ggc	cac	gac	gcg	ttc	ccg	576
45	Val	Phe	Gly	Thr	Trp	Leu	Pro	His	Arg	Pro	Gly	His	Asp	Ala	Phe	Pro	
				180					185				190				
	gac	cgc	cat	aat	gcg	cgg	tcg	tcg	cgg	atc	agc	gac	cct	gtg	tcg	ctg	624
50	Asp	Arg	His	Asn	Ala	Arg	Ser	Ser	Arg	Ile	Ser	Asp	Pro	Val	Ser	Leu	
			195					200					205				

ctg acc tgc ttt cat ttt ggc ggt tat cat cac gaa cac cac ctg cac 672  
 Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His  
 210 215 220

5

ccg acg gtg ccg tgg tgg cgc ctg ccc agc acc cgc acc aag ggg gac 720  
 Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp  
 225 230 235 240

10

acc gca tga 729  
 Thr Ala

15

<210> 10  
 <211> 242  
 <212> PRT

20

<213> Paracoccus marcusii

25

<400> 10  
 Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu  
 1 5 10 15

30

Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His  
 20 25 30

35

Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Val Ala  
 35 40 45

40

Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala  
 50 55 60

45

His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn  
 65 70 75 80

50

Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp  
 85 90 95

## 20

Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr  
 100 105 110

5 Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala  
 115 120 125

10 Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro  
 130 135 140

15 Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr  
 145 150 155 160

Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe  
 165 170 175

20 Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro  
 180 185 190

25 Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu  
 195 200 205

30 Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His  
 210 215 220

35 Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp  
 225 230 235 240

Thr Ala

40 <210> 11  
 <211> 1629

45 <212> DNA  
 <213> Synechococystis

50

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

5 &lt;222&gt; (1) .. (1629)

&lt;223&gt;

10

&lt;400&gt; 11

atg atc acc acc gat gtt gtc att att ggg gcg ggg cac aat ggc tta 48  
 Met Ile Thr Thr Asp Val Val Ile Ile Gly Ala Gly His Asn Gly Leu  
 1 5 10 15

15

gtc tgt gca gcc tat ttg ctc caa cgg ggc ttg ggg gtg acg tta cta 96  
 Val Cys Ala Ala Tyr Leu Leu Gln Arg Gly Leu Gly Val Thr Leu Leu  
 20 25 30

20

gaa aag cgg gaa gta cca ggg ggg gcg gcc acc aca gaa gct ctc atg 144  
 Glu Lys Arg Glu Val Pro Gly Gly Ala Ala Thr Thr Glu Ala Leu Met  
 35 40 45

25

ccg gag cta tcc ccc cag ttt cgc ttt aac cgc tgt gcc att gac cac 192  
 Pro Glu Leu Ser Pro Gln Phe Arg Phe Asn Arg Cys Ala Ile Asp His  
 50 55 60

30

gaa ttt atc ttt ctg ggg ccg gtg ttg cag gag cta aat tta gcc cag 240  
 Glu Phe Ile Phe Leu Gly Pro Val Leu Gln Glu Leu Asn Leu Ala Gln  
 65 70 75 80

35

tat ggt ttg gaa tat tta ttt tgt gac ccc agt gtt ttt tgt ccg ggg 288  
 Tyr Gly Leu Glu Tyr Leu Phe Cys Asp Pro Ser Val Phe Cys Pro Gly  
 85 90 95

ctg gat ggc caa gct ttt atg agc tac cgt tcc cta gaa aaa acc tgt 336  
 Leu Asp Gly Gln Ala Phe Met Ser Tyr Arg Ser Leu Glu Lys Thr Cys  
 100 105 110

40

gcc cac att gcc acc tat agc ccc cga gat gcg gaa aaa tat cgg caa 384  
 Ala His Ile Ala Thr Tyr Ser Pro Arg Asp Ala Glu Lys Tyr Arg Gln  
 115 120 125

45

ttt gtc aat tat tgg acg gat ttg ctc aac gct gtc cag cct gct ttt 432  
 Phe Val Asn Tyr Trp Thr Asp Leu Leu Asn Ala Val Gln Pro Ala Phe  
 130 135 140

50

aat gct ccg ccc cag gct tta cta gat tta gcc ctg aac tat ggt tgg 480  
 Asn Ala Pro Pro Gln Ala Leu Leu Asp Leu Ala Leu Asn Tyr Gly Trp  
 145 150 155 160



## 22

	gaa aac tta aaa tcc gtg ctg gcg atc gcc ggg tcg aaa acc aag gcg	528
	Glu Asn Leu Lys Ser Val Leu Ala Ile Ala Gly Ser Lys Thr Lys Ala	
	165 170 175	
5	ttg gat ttt atc cgc act atg atc ggc tcc ccg gaa gat gtg ctc aat	576
	Leu Asp Phe Ile Arg Thr Met Ile Gly Ser Pro Glu Asp Val Leu Asn	
	180 185 190	
10	gaa tgg ttc gac agc gaa cgg gtt aaa gct cct tta gct aga cta tgt	624
	Glu Trp Phe Asp Ser Glu Arg Val Lys Ala Pro Leu Ala Arg Leu Cys	
	195 200 205	
	tcg gaa att ggc gct ccc cca tcc caa aag ggt agt agc tcc ggc atg	672
15	Ser Glu Ile Gly Ala Pro Pro Ser Gln Lys Gly Ser Ser Ser Gly Met	
	210 215 220	
	atg atg gtg gcc atg cgg cat ttg gag gga att gcc aga cca aaa gga	720
	Met Met Val Ala Met Arg His Leu Glu Gly Ile Ala Arg Pro Lys Gly	
20	225 230 235 240	
	ggc act gga gcc ctc aca gaa gcc ttg gtg aag tta gtg caa gcc caa	768
	Gly Thr Gly Ala Leu Thr Glu Ala Leu Val Lys Leu Val Gln Ala Gln	
	245 250 255	
25	ggg gga aaa atc ctc act gac caa acc gtc aaa cgg gta ttg gtg gaa	816
	Gly Gly Lys Ile Leu Thr Asp Gln Thr Val Lys Arg Val Leu Val Glu	
	260 265 270	
30	aac aac cag gcg atc ggg gtg gag gta gct aac gga gaa cag tac cgg	864
	Asn Asn Gln Ala Ile Gly Val Glu Val Ala Asn Gly Glu Gln Tyr Arg	
	275 280 285	
	gcc aaa aaa ggc gtg att tct aac atc gat gcc cgc cgt tta ttt ttg	912
35	Ala Lys Lys Gly Val Ile Ser Asn Ile Asp Ala Arg Arg Leu Phe Leu	
	290 295 300	
	caa ttg gtg gaa ccg ggg gcc cta gcc aag gtg aat caa aac cta ggg	960
	Gln Leu Val Glu Pro Gly Ala Leu Ala Lys Val Asn Gln Asn Leu Gly	
40	305 310 315 320	
	gaa cga ctg gaa cgg cgc act gtg aac aat aac gaa gcc att tta aaa	1008
	Glu Arg Leu Glu Arg Arg Thr Val Asn Asn Asn Glu Ala Ile Leu Lys	
	325 330 335	
45	atc gat tgt gcc ctc tcc ggt tta ccc cac ttc act gcc atg gcc ggg	1056
	Ile Asp Cys Ala Leu Ser Gly Leu Pro His Phe Thr Ala Met Ala Gly	
	340 345 350	
50	ccg gag gat cta acg gga act att ttg att gcc gac tcg gta cgc cat	1104

## 23

	Pro Glu Asp Leu Thr Gly Thr Ile Leu Ile Ala Asp Ser Val Arg His	
	355	360 365
5	gtc gag gaa gcc cac gcc ctc att gcc ttg ggg caa att ccc gat gct Val Glu Glu Ala His Ala Leu Ile Ala Leu Gly Gln Ile Pro Asp Ala	1152
	370	375 380
10	aat ccg tct tta tat ttg gat att ccc act gta ttg gac ccc acc atg Asn Pro Ser Leu Tyr Leu Asp Ile Pro Thr Val Leu Asp Pro Thr Met	1200
	385	390 395 400
15	gcc ccc cct ggg cag cac acc ctc tgg atc gaa ttt ttt gcc ccc tac Ala Pro Pro Gly Gln His Thr Leu Trp Ile Glu Phe Phe Ala Pro Tyr	1248
	405	410 415
20	cgc atc gcc ggg ttg gaa ggg aca ggg tta atg ggc aca ggt tgg acc Arg Ile Ala Gly Leu Glu Gly Thr Gly Leu Met Gly Thr Gly Trp Thr	1296
	420	425 430
25	gat gag tta aag gaa aaa gtg gcg gat cgg gtg att gat aaa tta acg Asp Glu Leu Lys Glu Lys Val Ala Asp Arg Val Ile Asp Lys Leu Thr	1344
	435	440 445
30	gac tat gcc cct aac cta aaa tct ctg atc att ggt cgc cga gtg gaa Asp Tyr Ala Pro Asn Leu Lys Ser Leu Ile Ile Gly Arg Arg Val Glu	1392
	450	455 460
35	agt ccc gcc gaa ctg gcc caa cgg ctg gga agt tac aac ggc aat gtc Ser Pro Ala Glu Leu Ala Gln Arg Leu Gly Ser Tyr Asn Gly Asn Val	1440
	465	470 475 480
40	tat cat ctg gat atg agt ttg gac caa atg atg ttc ctc cgg cct cta Tyr His Leu Asp Met Ser Leu Asp Gln Met Met Phe Leu Arg Pro Leu	1488
	485	490 495
45	ccg gaa att gcc aac tac caa acc ccc atc aaa aat ctt tac tta aca Pro Glu Ile Ala Asn Tyr Gln Thr Pro Ile Lys Asn Leu Tyr Leu Thr	1536
	500	505 510
50	ggg gcg ggt acc cat ccc ggt ggc tcc ata tca ggt atg ccc ggt aga Gly Ala Gly Thr His Pro Gly Gly Ser Ile Ser Gly Met Pro Gly Arg	1584
	515	520 525
55	aat tgc gct cgg gtc ttt tta aaa caa caa cgt cgt ttt tgg taa Asn Cys Ala Arg Val Phe Leu Lys Gln Gln Arg Arg Phe Trp	1629
	530	535 540
	<210> 12	

&lt;211&gt; 542

&lt;212&gt; PRT

5 &lt;213&gt; Synechococystis

&lt;400&gt; 12

10

Met Ile Thr Thr Asp Val Val Ile Ile Gly Ala Gly His Asn Gly Leu  
 1 5 10 15

15 Val Cys Ala Ala Tyr Leu Leu Gln Arg Gly Leu Gly Val Thr Leu Leu  
 20 25 30

20 Glu Lys Arg Glu Val Pro Gly Gly Ala Ala Thr Thr Glu Ala Leu Met  
 35 40 45

25 Pro Glu Leu Ser Pro Gln Phe Arg Phe Asn Arg Cys Ala Ile Asp His  
 50 55 60

Glu Phe Ile Phe Leu Gly Pro Val Leu Gln Glu Leu Asn Leu Ala Gln  
 65 70 75 80

30

Tyr Gly Leu Glu Tyr Leu Phe Cys Asp Pro Ser Val Phe Cys Pro Gly  
 85 90 95

35 Leu Asp Gly Gln Ala Phe Met Ser Tyr Arg Ser Leu Glu Lys Thr Cys  
 100 105 110

40 Ala His Ile Ala Thr Tyr Ser Pro Arg Asp Ala Glu Lys Tyr Arg Gln  
 115 120 125

45 Phe Val Asn Tyr Trp Thr Asp Leu Leu Asn Ala Val Gln Pro Ala Phe  
 130 135 140

Asn Ala Pro Pro Gln Ala Leu Leu Asp Leu Ala Leu Asn Tyr Gly Trp  
 145 150 155 160

50

## 25

Glu Asn Leu Lys Ser Val Leu Ala Ile Ala Gly Ser Lys Thr Lys Ala  
165 170 175

5    Leu Asp Phe Ile Arg Thr Met Ile Gly Ser Pro Glu Asp Val Leu Asn  
                    180                    185                    190

Glu Trp Phe Asp Ser Glu Arg Val Lys Ala Pro Leu Ala Arg Leu Cys  
10           195                 200                 205

15 Ser Glu Ile Gly Ala Pro Pro Ser Gln Lys Gly Ser Ser Ser Gly Met  
210 215 220

Met Met Val Ala Met Arg His Leu Glu Gly Ile Ala Arg Pro Lys Gly  
225 230 235 240

20 Gly Thr Gly Ala Leu Thr Glu Ala Leu Val Lys Leu Val Gln Ala Gln  
245 250 255

25 Gly Gly Lys Ile Leu Thr Asp Gln Thr Val Lys Arg Val Leu Val Glu  
260 265 270

30 Asn Asn Gln Ala Ile Gly Val Glu Val Ala Asn Gly Glu Gln Tyr Arg  
275 280 285

Ala Lys Lys Gly Val Ile Ser Asn Ile Asp Ala Arg Arg Leu Phe Leu  
290 295 300

Gln Leu Val Glu Pro Gly Ala Leu Ala Lys Val Asn Gln Asn Leu Gly  
305 310 315 320

40           Glu Arg Leu Glu Arg Arg Thr Val Asn Asn Asn Glu Ala Ile Leu Lys  
                        325                         330                         335

45 Ile Asp Cys Ala Leu Ser Gly Leu Pro His Phe Thr Ala Met Ala Gly  
340 345 350

Pro Glu Asp Leu Thr Gly Thr Ile Leu Ile Ala Asp Ser Val Arg His  
50 355 360 365

Val Glu Glu Ala His Ala Leu Ile Ala Leu Gly Gln Ile Pro Asp Ala  
 370 375 380  
 5

Asn Pro Ser Leu Tyr Leu Asp Ile Pro Thr Val Leu Asp Pro Thr Met  
 385 390 395 400

10

Ala Pro Pro Gly Gln His Thr Leu Trp Ile Glu Phe Phe Ala Pro Tyr  
 405 410 415

15

Arg Ile Ala Gly Leu Glu Gly Thr Gly Leu Met Gly Thr Gly Trp Thr  
 420 425 430

20

Asp Glu Leu Lys Glu Lys Val Ala Asp Arg Val Ile Asp Lys Leu Thr  
 435 440 445

25

Asp Tyr Ala Pro Asn Leu Lys Ser Leu Ile Ile Gly Arg Arg Val Glu  
 450 455 460

30

Ser Pro Ala Glu Leu Ala Gln Arg Leu Gly Ser Tyr Asn Gly Asn Val  
 465 470 475 480

35

Tyr His Leu Asp Met Ser Leu Asp Gln Met Met Phe Leu Arg Pro Leu  
 485 490 495

40

Pro Glu Ile Ala Asn Tyr Gln Thr Pro Ile Lys Asn Leu Tyr Leu Thr  
 500 505 510

Gly Ala Gly Thr His Pro Gly Gly Ser Ile Ser Gly Met Pro Gly Arg  
 515 520 525

45

Asn Cys Ala Arg Val Phe Leu Lys Gln Gln Arg Arg Phe Trp  
 530 535 540

50

<210> 13

<211> 776

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Bradyrhizobium sp.

5

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

10

&lt;222&gt; (1)..(774)

&lt;223&gt;

15

&lt;400&gt; 13

atg cat gca gca acc gcc aag gct act gag ttc ggg gcc tct cgg cgc	48
Met His Ala Ala Thr Ala Lys Ala Thr Glu Phe Gly Ala Ser Arg Arg	
1 5 10 15	

20

gac gat gcg agg cag cgc cgc gtc ggt ctc acg ctg gcc gcg gtc atc	96
Asp Asp Ala Arg Gln Arg Arg Val Gly Leu Thr Leu Ala Ala Val Ile	
20 25 30	

25

atc gcc gcc tgg ctg gtg ctg cat gtc ggt ctg atg ttc ttc tgg ccg	144
Ile Ala Ala Trp Leu Val Leu His Val Gly Leu Met Phe Phe Trp Pro	
35 40 45	

30

ctg acc ctt cac agc ctg ctg ccg gct ttg cct ctg gtg gtg ctg cag	192
Leu Thr Leu His Ser Leu Leu Pro Ala Leu Pro Leu Val Val Leu Gln	
50 55 60	

35

acc tgg ctc tat gta ggc ctg ttc atc atc gcg cat gac tgc atg cac	240
Thr Trp Leu Tyr Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala His Asp Cys Met His	
65 70 75 80	

40

ggc tcg ctg gtg ccg ttc aag ccg cag gtc aac cgc cgt atc gga cag	288
Gly Ser Leu Val Pro Phe Lys Pro Gln Val Asn Arg Arg Ile Gly Gln	
85 90 95	

45

ctc tgc ctg ttc ctc tat gcc ggg ttc tcc ttc gac gct ctc aat gtc	336
Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Phe Asp Ala Leu Asn Val	
100 105 110	

gag cac cac aag cat cac cgc cat ccc ggc acg gcc gag gat ccc gat	384
Glu His His Lys His His Arg His Pro Gly Thr Ala Glu Asp Pro Asp	
115 120 125	

50

ttc gac gag gtg ccg ccg cac ggc ttc tgg cac tgg ttc gcc agc ttt	432
---	-----

## 28

	Phe Asp Glu Val Pro Pro His Gly Phe Trp His Trp Phe Ala Ser Phe	
	130 135 140	
5	ttc ctg cac tat ttc ggc tgg aag cag gtc gcg atc atc gca gcc gtc Phe Leu His Tyr Phe Gly Trp Lys Gln Val Ala Ile Ile Ala Ala Val	480
	145 150 155 160	
10	tcg ctg gtt tat cag ctc gtc ttc gcc gtt ccc ttg cag aac atc ctg Ser Leu Val Tyr Gln Leu Val Phe Ala Val Pro Leu Gln Asn Ile Leu	528
	165 170 175	
15	ctg ttc tgg gcg ctg ccc ggg ctg ctg tcg gcg ctg cag ctg ttc acc Leu Phe Trp Ala Leu Pro Gly Leu Leu Ser Ala Leu Gln Leu Phe Thr	576
	180 185 190	
	ttc ggc acc tat ctg ccg cac aag ccg gcc acg cag ccc ttc gcc gat Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Ala Thr Gln Pro Phe Ala Asp	624
	195 200 205	
20	cgc cac aac gcg cgg acg agc gaa ttt ccc gcg tgg ctg tcg ctg ctg Arg His Asn Ala Arg Thr Ser Glu Phe Pro Ala Trp Leu Ser Leu Leu	672
	210 215 220	
25	acc tgc ttc cac ttc ggc ttt cat cac gag cat cat ctg cat ccc gat Thr Cys Phe His Phe Gly Phe His His Glu His His Leu His Pro Asp	720
	225 230 235 240	
30	gcg ccg tgg tgg cgg ctg ccg gag atc aag cgg cgg gcc ctg gaa agg Ala Pro Trp Trp Arg Leu Pro Glu Ile Lys Arg Arg Ala Leu Glu Arg	768
	245 250 255	
	cgt gac ta Arg Asp	776
35		
	<210> 14	
40	<211> 258	
	<212> PRT	
	<213> Bradyrhizobium sp.	
45		
	<400> 14	
50	Met His Ala Ala Thr Ala Lys Ala Thr Glu Phe Gly Ala Ser Arg Arg	
	1 5 10 15	

Asp Asp Ala Arg Gln Arg Arg Val Gly Leu Thr Leu Ala Ala Val Ile  
 20 25 30  
 5

Ile Ala Ala Trp Leu Val Leu His Val Gly Leu Met Phe Phe Trp Pro  
 35 40 45

10

Leu Thr Leu His Ser Leu Leu Pro Ala Leu Pro Leu Val Val Leu Gln  
 50 55 60

15

Thr Trp Leu Tyr Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala His Asp Cys Met His  
 65 70 75 80

20

Gly Ser Leu Val Pro Phe Lys Pro Gln Val Asn Arg Arg Ile Gly Gln  
 85 90 95

25

Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Phe Asp Ala Leu Asn Val  
 100 105 110

30

Glu His His Lys His His Arg His Pro Gly Thr Ala Glu Asp Pro Asp  
 115 120 125

35

Phe Asp Glu Val Pro Pro His Gly Phe Trp His Trp Phe Ala Ser Phe  
 130 135 140

40

Phe Leu His Tyr Phe Gly Trp Lys Gln Val Ala Ile Ile Ala Ala Val  
 145 150 155 160

Ser Leu Val Tyr Gln Leu Val Phe Ala Val Pro Leu Gln Asn Ile Leu  
 165 170 175

45

Leu Phe Trp Ala Leu Pro Gly Leu Leu Ser Ala Leu Gln Leu Phe Thr  
 180 185 190

50

Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Ala Thr Gln Pro Phe Ala Asp  
 195 200 205



## 30

Arg His Asn Ala Arg Thr Ser Glu Phe Pro Ala Trp Leu Ser Leu Leu  
 210 215 220

5 Thr Cys Phe His Phe Gly Phe His His Glu His His Leu His Pro Asp  
 225 230 235 240

10 Ala Pro Trp Trp Arg Leu Pro Glu Ile Lys Arg Arg Ala Leu Glu Arg  
 245 250 255

Arg Asp

15

<210> 15

<211> 777

20

<212> DNA

<213> Nostoc sp.

25

<220>

<221> CDS

30

<222> (1) .. (777)

<223>

35

<400> 15

atg gtt cag tgt caa cca tca tct ctg cat tca gaa aaa ctg gtg tta 48  
 Met Val Gln Cys Gln Pro Ser Ser Leu His Ser Glu Lys Leu Val Leu

40

1 5 10 15

ttg tca tcg aca atc aga gat gat aaa aat att aat aag ggt ata ttt 96  
 Leu Ser Ser Thr Ile Arg Asp Asp Lys Asn Ile Asn Lys Gly Ile Phe  
 20 25 30

45

att gcc tgc ttt atc tta ttt tta tgg gca att agt tta atc tta tta 144  
 Ile Ala Cys Phe Ile Leu Phe Leu Trp Ala Ile Ser Leu Ile Leu Leu  
 35 40 45

50

ctc tca ata gat aca tcc ata att cat aag agc tta tta ggt ata gcc 192

## 31

	Leu Ser Ile Asp Thr Ser Ile Ile His Lys Ser Leu Leu Gly Ile Ala	
	50 55 60	
5	atg ctt tgg cag acc ttc tta tat aca ggt tta ttt att act gct cat Met Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His	240
	65 70 75 80	
10	gat gcc atg cac ggc gta gtt tat ccc aaa aat ccc aga ata aat aat Asp Ala Met His Gly Val Val Tyr Pro Lys Asn Pro Arg Ile Asn Asn	288
	85 90 95	
15	ttt ata ggt aag ctc act cta atc ttg tat gga cta ctc cct tat aaa Phe Ile Gly Lys Leu Thr Leu Ile Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Lys	336
	100 105 110	
20	gat tta ttg aaa aaa cat tgg tta cac cac gga cat cct ggt act gat Asp Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His Gly His Pro Gly Thr Asp	384
	115 120 125	
25	tta gac cct gat tat tac aat ggt cat ccc caa aac ttc ttt ctt tgg Leu Asp Pro Asp Tyr Tyr Asn Gly His Pro Gln Asn Phe Phe Leu Trp	432
	130 135 140	
30	tat cta cat ttt atg aag tct tat tgg cga tgg acg caa att ttc gga Tyr Leu His Phe Met Lys Ser Tyr Trp Arg Trp Thr Gln Ile Phe Gly	480
	145 150 155 160	
35	tta gtg atg att ttt cat gga ctt aaa aat ctg gtg cat ata cca gaa Leu Val Met Ile Phe His Gly Leu Lys Asn Leu Val His Ile Pro Glu	528
	165 170 175	
40	aat aat tta att ata ttt tgg atg ata cct tct att tta agt tca gta Asn Asn Leu Ile Ile Phe Trp Met Ile Pro Ser Ile Leu Ser Ser Val	576
	180 185 190	
45	caa cta ttt tat ttt ggt aca ttt ttg cct cat aaa aag cta gaa ggt Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Lys Lys Leu Glu Gly	624
	195 200 205	
50	ggt tat act aac ccc cat tgt gcg cgc agt atc cca tta cct ctt ttt Gly Tyr Thr Asn Pro His Cys Ala Arg Ser Ile Pro Leu Pro Leu Phe	672
	210 215 220	
55	tgg tct ttt gtt act tgt tat cac ttc ggc tac cac aag gaa cat cac Trp Ser Phe Val Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Lys Glu His His	720
	225 230 235 240	
60	gaa tac cct caa ctt cct tgg tgg aaa tta cct gaa gct cac aaa ata Glu Tyr Pro Gln Leu Pro Trp Trp Lys Leu Pro Glu Ala His Lys Ile	768
	245 250 255	

tct tta taa  
Ser Leu

777

5

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 258

10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Nostoc sp.

15

&lt;400&gt; 16

Met Val Gln Cys Gln Pro Ser Ser Leu His Ser Glu Lys Leu Val Leu  
20 1 5 10 15

Leu Ser Ser Thr Ile Arg Asp Asp Lys Asn Ile Asn Lys Gly Ile Phe  
25 20 25 30

Ile Ala Cys Phe Ile Leu Phe Leu Trp Ala Ile Ser Leu Ile Leu Leu  
35 40 45

30

Leu Ser Ile Asp Thr Ser Ile Ile His Lys Ser Leu Leu Gly Ile Ala  
50 55 60

Met Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His  
35 65 70 75 80

Asp Ala Met His Gly Val Val Tyr Pro Lys Asn Pro Arg Ile Asn Asn  
40 85 90 95

Phe Ile Gly Lys Leu Thr Leu Ile Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Lys  
45 100 105 110

Asp Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His Gly His Pro Gly Thr Asp  
115 120 125

50

## 33

Leu Asp Pro Asp Tyr Tyr Asn Gly His Pro Gln Asn Phe Phe Leu Trp  
 130 135 140

5 Tyr Leu His Phe Met Lys Ser Tyr Trp Arg Trp Thr Gln Ile Phe Gly  
 145 150 155 160

10 Leu Val Met Ile Phe His Gly Leu Lys Asn Leu Val His Ile Pro Glu  
 165 170 175

15 Asn Asn Leu Ile Ile Phe Trp Met Ile Pro Ser Ile Leu Ser Ser Val  
 180 185 190

Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Lys Lys Leu Glu Gly  
 195 200 205

20 Gly Tyr Thr Asn Pro His Cys Ala Arg Ser Ile Pro Leu Pro Leu Phe  
 210 215 220

25 Trp Ser Phe Val Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Lys Glu His His  
 225 230 235 240

30 Glu Tyr Pro Gln Leu Pro Trp Trp Lys Leu Pro Glu Ala His Lys Ile  
 245 250 255

Ser Leu

35

<210> 17

<211> 1608

40

<212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

45

<220>

<221> CDS

50

&lt;222&gt; (3) .. (971)

&lt;223&gt;

5

&lt;400&gt; 17

	ct	aca	ttt	cac	aag	ccc	gtg	agc	ggt	gca	agc	gct	ctg	ccc	cac	atc	47
	Thr	Phe	His	Lys	Pro	Val	Ser	Gly	Ala	Ser	Ala	Leu	Pro	His	Ile		
10	1				5					10				15			
	ggc	cca	cct	cct	cat	ctc	cat	cgg	tca	ttt	gct	gct	acc	acg	atg	ctg	95
	Gly	Pro	Pro	Pro	His	Leu	His	Arg	Ser	Phe	Ala	Ala	Thr	Thr	Met	Leu	
					20				25					30			
15	tcg	aag	ctg	cag	tca	atc	agc	gtc	aag	gcc	cgc	cgc	gtt	gaa	cta	gcc	143
	Ser	Lys	Leu	Gln	Ser	Ile	Ser	Val	Lys	Ala	Arg	Arg	Val	Glu	Leu	Ala	
				35				40					45				
20	cgc	gac	atc	acg	cgg	ccc	aaa	gtc	tgc	ctg	cat	gct	cag	cgg	tgc	tcg	191
	Arg	Asp	Ile	Thr	Arg	Pro	Lys	Val	Cys	Leu	His	Ala	Gln	Arg	Cys	Ser	
		50						55				60					
	tta	gtt	cgg	ctg	cga	gtg	gca	gca	cca	cag	aca	gag	gag	gcg	ctg	gga	239
25	Leu	Val	Arg	Leu	Arg	Val	Ala	Ala	Pro	Gln	Thr	Glu	Glu	Ala	Leu	Gly	
		65					70				75						
	acc	gtg	cag	gct	gcc	ggc	gcg	ggc	gat	gag	cac	agc	gcc	gat	gta	gca	287
	Thr	Val	Gln	Ala	Ala	Gly	Ala	Gly	Asp	Glu	His	Ser	Ala	Asp	Val	Ala	
30	80				85				90				95				
	ctc	cag	cag	ctt	gac	cgg	gct	atc	gca	gag	cgt	cgt	gcc	cgg	cgc	aaa	335
	Leu	Gln	Gln	Leu	Asp	Arg	Ala	Ile	Ala	Glu	Arg	Arg	Ala	Arg	Arg	Lys	
				100					105				110				
35	cgg	gag	cag	ctg	tca	tac	cag	gct	gcc	gcc	att	gca	gca	tca	att	ggc	383
	Arg	Glu	Gln	Leu	Ser	Tyr	Gln	Ala	Ala	Ala	Ile	Ala	Ala	Ser	Ile	Gly	
				115				120				125					
40	gtg	tca	ggc	att	gcc	atc	ttc	gcc	acc	tac	ctg	aga	ttt	gcc	atg	cac	431
	Val	Ser	Gly	Ile	Ala	Ile	Phe	Ala	Thr	Tyr	Leu	Arg	Phe	Ala	Met	His	
		130					135				140						
	atg	acc	gtg	ggc	ggc	gca	gtg	cca	tgg	ggt	gaa	gtg	gct	ggc	act	ctc	479
45	Met	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Val	Pro	Trp	Gly	Glu	Val	Ala	Gly	Thr	Leu	
		145				150					155						
	ctc	ttg	gtg	gtt	ggt	ggc	gcg	ctc	ggc	atg	gag	atg	tat	gcc	cgc	tat	527
	Leu	Leu	Val	Val	Gly	Gly	Ala	Leu	Gly	Met	Glu	Met	Tyr	Ala	Arg	Tyr	
50	160				165				170				175				

## 35

	gca cac aaa gcc atc tgg cat gag tgc cct ctg ggc tgg ctg ctg cac	575
	Ala His Lys Ala Ile Trp His Glu Ser Pro Leu Gly Trp Leu Leu His	
	180 185 190	
5	aag agc cac cac aca cct cgc act gga ccc ttt gaa gcc aac gac ttg	623
	Lys Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu	
	195 200 205	
10	ttt gca atc atc aat gga ctg ccc gcc atg ctc ctg tgt acc ttt ggc	671
	Phe Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly	
	210 215 220	
15	ttc tgg ctg ccc aac gtc ctg ggg gcg gcc tgc ttt gga gcg ggg ctg	719
	Phe Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu	
	225 230 235	
20	ggc atc acg cta tac ggc atg gca tat atg ttt gta cac gat ggc ctg	767
	Gly Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu	
	240 245 250 255	
25	gtg cac agg cgc ttt ccc acc ggg ccc atc gct ggc ctg ccc tac atg	815
	Val His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met	
	260 265 270	
30	aag cgc ctg aca gtg gcc cac cag cta cac cac agc ggc aag tac ggt	863
	Lys Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly	
	275 280 285	
35	ggc gcg ccc tgg ggt atg ttc ttg ggt cca cag gag ctg cag cac att	911
	Gly Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile	
	290 295 300	
40	cca ggt gcg gcg gag gag gtg gag cga ctg gtc ctg gaa ctg gac tgg	959
	Pro Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp	
	305 310 315	
45	tcc aag cgg tag ggtgcggaac caggcacgct ggtttcacac ctcatgcctg	1011
	Ser Lys Arg	
	320	
50	tgataaggtg tggetagagc gatgcgtgtg agacgggtat gtcacggctg actggtctga	1071
	tgccaatgg catcgcccat gtctgggtcat cacgggctgg ttgcctgggt gaaggtgatg	1131
	cacatcatca tgtgcggttg gaggggctgg cacagtgtgg gctgaactgg agcagttgtc	1191
	caggctggcg ttgaatcagt gagggtttgt gattggcggt tgtgaagcaa tgactccgcc	1251
	catattctat ttgtgggagc tgagatgatg gcatgcttgg gatgtgcatg gatcatggta	1311

gtgcagcaaa ctatattcac ctagggctgt tggtaggatac aggtgaggcc ttgcacattg 1371  
 catgatgtac tcgtcatggt gtgttggtga gaggatggat gtggatggat gtgtattctc 1431  
 5 agacgtagac cttgactgga ggcttgatcg agagagtggg ccgtattctt tgagagggga 1491  
 ggctcgtgcc agaaatggtg agtggatgac tgtgacgctg tacattgcag gcaggtgaga 1551  
 10 tgcactgtct cgattgtaaa atacattcag atgcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1608

<210> 18

15 <211> 322

<212> PRT

20 <213> Haematococcus pluvialis

<400> 18

25 Thr Phe His Lys Pro Val Ser Gly Ala Ser Ala Leu Pro His Ile Gly  
 1 5 10 15

30 Pro Pro Pro His Leu His Arg Ser Phe Ala Ala Thr Thr Met Leu Ser  
 20 25 30

35 Lys Leu Gln Ser Ile Ser Val Lys Ala Arg Arg Val Glu Leu Ala Arg  
 35 40 45

40 Asp Ile Thr Arg Pro Lys Val Cys Leu His Ala Gln Arg Cys Ser Leu  
 50 55 60

45 Val Arg Leu Arg Val Ala Ala Pro Gln Thr Glu Glu Ala Leu Gly Thr  
 65 70 75 80

Val Gln Ala Ala Gly Ala Gly Asp Glu His Ser Ala Asp Val Ala Leu  
 85 90 95

50 Gln Gln Leu Asp Arg Ala Ile Ala Glu Arg Arg Ala Arg Arg Lys Arg  
 100 105 110

Glu Gln Leu Ser Tyr Gln Ala Ala Ala Ile Ala Ala Ser Ile Gly Val  
 115 120 125  
 5

Ser Gly Ile Ala Ile Phe Ala Thr Tyr Leu Arg Phe Ala Met His Met  
 130 135 140

10

Thr Val Gly Gly Ala Val Pro Trp Gly Glu Val Ala Gly Thr Leu Leu  
 145 150 155 160

15

Leu Val Val Gly Gly Ala Leu Gly Met Glu Met Tyr Ala Arg Tyr Ala  
 165 170 175

20

His Lys Ala Ile Trp His Glu Ser Pro Leu Gly Trp Leu Leu His Lys  
 180 185 190

Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu Phe  
 195 200 205  
 25

Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly Phe  
 210 215 220

30

Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu Gly  
 225 230 235 240

35

Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu Val  
 245 250 255

40

His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met Lys  
 260 265 270

Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly Gly  
 275 280 285  
 45

Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile Pro  
 290 295 300

50



## 38

Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp Ser  
 305 310 315 320

5 Lys Arg

<210> 19

10

<211> 1503

<212> DNA

15 <213> Tomate

<220>

20

<221> CDS

<222> (1) .. (1503)

25 <223>

<400> 19

30 atg gat act ttg ttg aaa acc cca aat aac ctt gaa ttt ctg aac cca 48  
 Met Asp Thr Leu Leu Lys Thr Pro Asn Asn Leu Glu Phe Leu Asn Pro  
 1 5 10 15

35 cat cat ggt ttt gct gtt aaa gct agt acc ttt aga tct gag aag cat 96  
 His His Gly Phe Ala Val Lys Ala Ser Thr Phe Arg Ser Glu Lys His  
 20 25 30

40 cat aat ttt ggt tct agg aag ttt tgt gaa act ttg ggt aga agt gtt 144  
 His Asn Phe Gly Ser Arg Lys Phe Cys Glu Thr Leu Gly Arg Ser Val  
 35 40 45

45 tgt gtt aag ggt agt agt agt gct ctt tta gag ctt gta cct gag acc 192  
 Cys Val Lys Gly Ser Ser Ala Leu Leu Glu Leu Val Pro Glu Thr  
 50 55 60

aaa aag gag aat ctt gat ttt gag ctt cct atg tat gac cct tca aaa 240  
 Lys Lys Glu Asn Leu Asp Phe Glu Leu Pro Met Tyr Asp Pro Ser Lys  
 65 70 75 80

50 ggg gtt gtt gtg gat ctt gct gtg gtt ggt ggt ggc cct gca gga ctt 288

## 39

	Gly Val Val Val Asp Leu Ala Val Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly Leu	
	85 90 95	
5	gct gtt gca cag caa gtt tct gaa gca gga ctc tct gtt tgt tca att Ala Val Ala Gln Gln Val Ser Glu Ala Gly Leu Ser Val Cys Ser Ile	336
	100 105 110	
10	gat ccg aat cct aaa ttg ata tgg cct aat aac tat ggt gtt tgg gtg Asp Pro Asn Pro Lys Leu Ile Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val	384
	115 120 125	
15	gat gaa ttt gag gct atg gac ttg tta gat tgt cta gat gct acc tgg Asp Glu Phe Glu Ala Met Asp Leu Leu Asp Cys Leu Asp Ala Thr Trp	432
	130 135 140	
20	tct ggt gca gca gtg tac att gat gat aat acg gct aaa gat ctt cat Ser Gly Ala Ala Val Tyr Ile Asp Asp Asn Thr Ala Lys Asp Leu His	480
	145 150 155 160	
25	aga cct tat gga agg gtt aac cgg aaa cag ctg aaa tcg aaa atg atg Arg Pro Tyr Gly Arg Val Asn Arg Lys Gln Leu Lys Ser Lys Met Met	528
	165 170 175	
30	cag aaa tgt ata atg aat ggt gtt aaa ttc cac caa gcc aaa gtt ata Gln Lys Cys Ile Met Asn Gly Val Lys Phe His Gln Ala Lys Val Ile	576
	180 185 190	
35	aag gtg att cat gag gaa tcg aaa tcc atg ttg ata tgc aat gat ggt Lys Val Ile His Glu Glu Ser Lys Ser Met Leu Ile Cys Asn Asp Gly	624
	195 200 205	
40	att act att cag gca acg gtg gtg ctc gat gca act ggc ttc tct aga Ile Thr Ile Gln Ala Thr Val Val Leu Asp Ala Thr Gly Phe Ser Arg	672
	210 215 220	
45	tct ctt gtt cag tat gat aag cct tat aac ccc ggg tat caa gtt gct Ser Leu Val Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Asn Pro Gly Tyr Gln Val Ala	720
	225 230 235 240	
50	tat ggc att ttg gct gaa gtg gaa gag cac ccc ttt gat gta aac aag Tyr Gly Ile Leu Ala Glu Val Glu Glu His Pro Phe Asp Val Asn Lys	768
	245 250 255	
55	atg gtt ttc atg gat tgg cga gat tct cat ttg aag aac aat act gat Met Val Phe Met Asp Trp Arg Asp Ser His Leu Lys Asn Asn Thr Asp	816
	260 265 270	
60	ctc aag gag aga aat agt aga ata cca act ttt ctt tat gca atg cca Leu Lys Glu Arg Asn Ser Arg Ile Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro	864
	275 280 285	

	ttt tca tcc aac agg ata ttt ctt gaa gaa aca tca ctc gta gct cgt	912
	Phe Ser Ser Asn Arg Ile Phe Leu Glu Glu Thr Ser Leu Val Ala Arg	
	290 295 300	
5	cct ggc ttg cgt ata gat gat att caa gaa cga atg gtg gct cgt tta	960
	Pro Gly Leu Arg Ile Asp Asp Ile Gln Glu Arg Met Val Ala Arg Leu	
	305 310 315 320	
10	aac cat ttg ggg ata aaa gtg aag agc att gaa gaa gat gaa cat tgt	1008
	Asn His Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Ile Glu Glu Asp Glu His Cys	
	325 330 335	
15	cta ata cca atg ggt ggt cca ctt cca gta tta cct cag aga gtc gtt	1056
	Leu Ile Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Val Leu Pro Gln Arg Val Val	
	340 345 350	
20	gga atc ggt ggt aca gct ggc atg gtt cat cca tcc acc ggt tat atg	1104
	Gly Ile Gly Gly Thr Ala Gly Met Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met	
	355 360 365	
25	gtg gca agg aca cta gct gcg gct cct gtt gtt gcc aat gcc ata att	1152
	Val Ala Arg Thr Leu Ala Ala Ala Pro Val Val Ala Asn Ala Ile Ile	
	370 375 380	
30	caa tac ctc ggt tct gaa aga agt cat tcg ggt aat gaa tta tcc aca	1200
	Gln Tyr Leu Gly Ser Glu Arg Ser His Ser Gly Asn Glu Leu Ser Thr	
	385 390 395 400	
35	gct gtt tgg aaa gat ttg tgg cct ata gag agg aga cgt caa aga gag	1248
	Ala Val Trp Lys Asp Leu Trp Pro Ile Glu Arg Arg Arg Gln Arg Glu	
	405 410 415	
40	ttc ttc tgc ttc ggt atg gat att ctt ctg aag ctt gat tta cct gct	1296
	Phe Phe Cys Phe Gly Met Asp Ile Leu Leu Lys Leu Asp Leu Pro Ala	
	420 425 430	
45	aca aga agg ttc ttt gat gca ttc ttt gac tta gaa cct cgt tat tgg	1344
	Thr Arg Arg Phe Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Glu Pro Arg Tyr Trp	
	435 440 445	
50	cat ggc ttc tta tcg tct cga ttg ttt cta cct gaa ctc ata gtt ttt	1392
	His Gly Phe Leu Ser Ser Arg Leu Phe Leu Pro Glu Leu Ile Val Phe	
	450 455 460	
55	ggg ctg tct cta ttc tct cat gct tca aat act tct aga ttt gag ata	1440
	Gly Leu Ser Leu Phe Ser His Ala Ser Asn Thr Ser Arg Phe Glu Ile	
	465 470 475 480	
60	atg aca aag gga act gtt cca tta gta aat atg atc aac aat ttg tta	1488

## 41

Met Thr Lys Gly Thr Val Pro Leu Val Asn Met Ile Asn Asn Leu Leu  
485 490 495

cag gat aaa gaa tga 1503

5 Gln Asp Lys Glu  
500

<210> 20

10 <211> 500

<212> PRT

15 <213> Tomate

<400> 20

20 Met Asp Thr Leu Leu Lys Thr Pro Asn Asn Leu Glu Phe Leu Asn Pro  
1 5 10 15

25 His His Gly Phe Ala Val Lys Ala Ser Thr Phe Arg Ser Glu Lys His  
20 25 30

His Asn Phe Gly Ser Arg Lys Phe Cys Glu Thr Leu Gly Arg Ser Val  
30 35 40 45

Cys Val Lys Gly Ser Ser Ser Ala Leu Leu Glu Leu Val Pro Glu Thr  
50 55 60

35 Lys Lys Glu Asn Leu Asp Phe Glu Leu Pro Met Tyr Asp Pro Ser Lys  
65 70 75 80

40 Gly Val Val Val Asp Leu Ala Val Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly Leu  
85 90 95

45 Ala Val Ala Gln Gln Val Ser Glu Ala Gly Leu Ser Val Cys Ser Ile  
100 105 110

Asp Pro Asn Pro Lys Leu Ile Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val  
50 115 120 125

Asp Glu Phe Glu Ala Met Asp Leu Leu Asp Cys Leu Asp Ala Thr Trp  
 130 135 140  
 5

Ser Gly Ala Ala Val Tyr Ile Asp Asp Asn Thr Ala Lys Asp Leu His  
 145 150 155 160

10

Arg Pro Tyr Gly Arg Val Asn Arg Lys Gln Leu Lys Ser Lys Met Met  
 165 170 175

15

Gln Lys Cys Ile Met Asn Gly Val Lys Phe His Gln Ala Lys Val Ile  
 180 185 190

20

Lys Val Ile His Glu Glu Ser Lys Ser Met Leu Ile Cys Asn Asp Gly  
 195 200 205

25

Ile Thr Ile Gln Ala Thr Val Val Leu Asp Ala Thr Gly Phe Ser Arg  
 210 215 220

30

Ser Leu Val Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Asn Pro Gly Tyr Gln Val Ala  
 225 230 235 240

Tyr Gly Ile Leu Ala Glu Val Glu Glu His Pro Phe Asp Val Asn Lys  
 245 250 255

35

Met Val Phe Met Asp Trp Arg Asp Ser His Leu Lys Asn Asn Thr Asp  
 260 265 270

40

Leu Lys Glu Arg Asn Ser Arg Ile Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro  
 275 280 285

45

Phe Ser Ser Asn Arg Ile Phe Leu Glu Glu Thr Ser Leu Val Ala Arg  
 290 295 300

50

Pro Gly Leu Arg Ile Asp Asp Ile Gln Glu Arg Met Val Ala Arg Leu  
 305 310 315 320

## 43

Asn His Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Ile Glu Glu Asp Glu His Cys  
 325 330 335

5 Leu Ile Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Val Leu Pro Gln Arg Val Val  
 340 345 350

10 Gly Ile Gly Gly Thr Ala Gly Met Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met  
 355 360 365

15 Val Ala Arg Thr Leu Ala Ala Ala Pro Val Val Ala Asn Ala Ile Ile  
 370 375 380

Gln Tyr Leu Gly Ser Glu Arg Ser His Ser Gly Asn Glu Leu Ser Thr  
 385 390 395 400

20 Ala Val Trp Lys Asp Leu Trp Pro Ile Glu Arg Arg Arg Gln Arg Glu  
 405 410 415

25 Phe Phe Cys Phe Gly Met Asp Ile Leu Leu Lys Leu Asp Leu Pro Ala  
 420 425 430

30 Thr Arg Arg Phe Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Glu Pro Arg Tyr Trp  
 435 440 445

35 His Gly Phe Leu Ser Ser Arg Leu Phe Leu Pro Glu Leu Ile Val Phe  
 450 455 460

Gly Leu Ser Leu Phe Ser His Ala Ser Asn Thr Ser Arg Phe Glu Ile  
 465 470 475 480

40 Met Thr Lys Gly Thr Val Pro Leu Val Asn Met Ile Asn Asn Leu Leu  
 485 490 495

45 Gln Asp Lys Glu  
 500

50 <210> 21

<211> 195

<212> DNA

5 <213> Kartoffel

<220>

10

<221> Intron

<222> (1) .. (195)

15 <223>

<400> 21

20 tacgtaagtt tctgcttcta cctttgatat atatataata attatcatta attagtagta 60

atataatatt tcaaataattt ttttcaaaat aaaagaatgt agtatatagc aattgctttt 120

ctgtagttta taagtgtgta tattttaatt tataactttt ctaatatatg accaaaattt 180

25

gttgatgtgc agctg 195

<210> 22

30

<211> 1155

<212> DNA

35 <213> Haematococcus pluvialis

<220>

40

<221> CDS

<222> (6) .. (995)

45 <223>

<400> 22

50 gaagc atg cag cta gca gcg aca gta atg ttg gag cag ctt acc gga agc 50

## 45

	Met	Gln	Leu	Ala	Ala	Thr	Val	Met	Leu	Glu	Gln	Leu	Thr	Gly	Ser		
	1				5					10					15		
5	gct	gag	gca	ctc	aag	gag	aag	gag	aag	gag	gtt	gca	ggc	agc	tct	gac	98
	Ala	Glu	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Gly	Ser	Ser	Asp	
				20						25				30			
10	gtg	ttg	cgt	aca	tgg	gcg	acc	cag	tac	tcg	ctt	ccg	tca	gag	gag	tca	146
	Val	Leu	Arg	Thr	Trp	Ala	Thr	Gln	Tyr	Ser	Leu	Pro	Ser	Glu	Glu	Ser	
				35				40					45				
15	gac	gcg	gcc	cgc	ccg	gga	ctg	aag	aat	gcc	tac	aag	cca	cca	cct	tcc	194
	Asp	Ala	Ala	Arg	Pro	Gly	Leu	Lys	Asn	Ala	Tyr	Lys	Pro	Pro	Pro	Ser	
			50				55						60				
	gac	aca	aag	ggc	atc	aca	atg	gcg	cta	gct	gtc	atc	ggc	tcc	tgg	gcc	242
	Asp	Thr	Lys	Gly	Ile	Thr	Met	Ala	Leu	Ala	Val	Ile	Gly	Ser	Trp	Ala	
		65				70					75						
20	gca	gtg	ttc	ctc	cac	gcc	att	ttt	caa	atc	aag	ctt	ccg	acc	tcc	ttg	290
	Ala	Val	Phe	Leu	His	Ala	Ile	Phe	Gln	Ile	Lys	Leu	Pro	Thr	Ser	Leu	
		80				85					90				95		
25	gac	cag	ctg	cac	tgg	ctg	ccc	gtg	tca	gat	gcc	aca	gct	cag	ctg	gtt	338
	Asp	Gln	Leu	His	Trp	Leu	Pro	Val	Ser	Asp	Ala	Thr	Ala	Gln	Leu	Val	
				100						105				110			
30	agc	ggc	agc	agc	agc	ctg	ctg	cac	atc	gtc	gta	gta	ttc	ttt	gtc	ctg	386
	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Leu	Leu	His	Ile	Val	Val	Val	Phe	Phe	Val	Leu	
				115					120				125				
35	gag	ttc	ctg	tac	aca	ggc	ctt	ttt	atc	acc	acg	cat	gat	gct	atg	cat	434
	Glu	Phe	Leu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Phe	Ile	Thr	Thr	His	Asp	Ala	Met	His	
			130				135						140				
	ggc	acc	atc	gcc	atg	aga	aac	agg	cag	ctt	aat	gac	ttc	ttg	ggc	aga	482
	Gly	Thr	Ile	Ala	Met	Arg	Asn	Arg	Gln	Leu	Asn	Asp	Phe	Leu	Gly	Arg	
		145				150					155						
40	gta	tgc	atc	tcc	ttg	tac	gcc	tgg	ttt	gat	tac	aac	atg	ctg	cac	cgc	530
	Val	Cys	Ile	Ser	Leu	Tyr	Ala	Trp	Phe	Asp	Tyr	Asn	Met	Leu	His	Arg	
		160				165					170				175		
45	aag	cat	tgg	gag	cac	cac	aac	cac	act	ggc	gag	gtg	ggc	aag	gac	cct	578
	Lys	His	Trp	Glu	His	His	Asn	His	Thr	Gly	Glu	Val	Gly	Lys	Asp	Pro	
				180						185				190			
50	gac	ttc	cac	agg	gga	aac	cct	ggc	att	gtg	ccc	tgg	ttt	gcc	agc	ttc	626
	Asp	Phe	His	Arg	Gly	Asn	Pro	Gly	Ile	Val	Pro	Trp	Phe	Ala	Ser	Phe	
			195					200					205				



	atg tcc agc tac atg tcg atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca tgg tgg	674
	Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp	
	210 215 220	
5	acg gtg gtc atg cag ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg ctg gtg	722
	Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val	
	225 230 235	
10	ttc atg gcg gcc gcg ccc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc tac ttt	770
	Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe	
	240 245 250 255	
15	ggc acg tac atg ccc cac aag cct gag cct gcc gcc gcg tca ggc tct	818
	Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser	
	260 265 270	
20	tca cca gcc gtc atg aac tgg tgg aag tcg cgc act agc cag gcg tcc	866
	Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser	
	275 280 285	
25	gac ctg gtc agc ttt ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac tgg gag	914
	Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu	
	290 295 300	
30	cac cac cgc tgg ccc ttt gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc	962
	His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg	
	305 310 315	
35	cgc ctg tct gcc cga ggt ctg gtt cct gcc tag ctggacacac tgcagtgggc	1015
	Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala	
	320 325	
40	cctgctgccca gctgggcatg cagggttggtg caggactggg tgagggtgaaa agctgcagggc	1075
	gctgctgccg gacacgctgc atgggctacc ctgtgtagct gccgccacta ggggagggggg	1135
	ttttagctg tcgagcttgc	1155
45	<210> 23	
	<211> 329	
	<212> PRT	
	<213> Haematococcus pluvialis	

47

&lt;400&gt; 23

Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala  
 1 5 10 15  
 5

Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val  
 20 25 30

10  
 Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp  
 35 40 45

15  
 Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp  
 50 55 60

20  
 Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala  
 65 70 75 80

25  
 Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp  
 85 90 95

30  
 Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser  
 100 105 110

Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu  
 115 120 125

35  
 Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly  
 130 135 140

40  
 Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val  
 145 150 155 160

45  
 Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys  
 165 170 175

50  
 His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp  
 180 185 190

## 48

Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met  
 195 200 205

5 Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr  
 210 215 220

10 Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe  
 225 230 235 240

15 Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly  
 245 250 255

Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser  
 260 265 270

20 Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp  
 275 280 285

25 Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His  
 290 295 300

30 His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg  
 305 310 315 320

35 Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala  
 325

<210> 24

<211> 1111

40 <212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

45 <220>

<221> CDS

50

&lt;222&gt; (4) .. (951)

&lt;223&gt;

5

&lt;400&gt; 24

	tgc atg cta gag gca ctc aag gag aag gag aag gag gtt gca ggc agc	48
	Met Leu Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser	
10	1 5 10 15	
	tct gac gtg ttg cgt aca tgg gcg acc cag tac tcg ctt ccg tca gaa	96
	Ser Asp Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu	
	20 25 30	
15		
	gag tca gac gcg gcc cgc ccg gga ctg aag aat gcc tac aag cca cca	144
	Glu Ser Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro	
	35 40 45	
20		
	cct tcc gac aca aag ggc atc aca atg gcg cta gct gtc atc ggc tcc	192
	Pro Ser Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser	
	50 55 60	
	tgg gcc gca gtg ttc ctc cac gcc att ttt caa atc aag ctt ccg acc	240
25	Trp Ala Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr	
	65 70 75	
	tcc ttg gac cag ctg cac tgg ctg ccc gtg tca gat gcc aca gct cag	288
	Ser Leu Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln	
30	80 85 90 95	
	ctg gtt agc ggc agc agc agc ctg ctg cac atc gtc gta gta ttc ttt	336
	Leu Val Ser Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe	
	100 105 110	
35		
	gtc ctg gag ttc ctg tac aca ggc ctt ttt atc acc acg cat gat gct	384
	Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala	
	115 120 125	
40		
	atg cat ggc acc atc gcc atg aga aac agg cag ctt aat gac ttc ttg	432
	Met His Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu	
	130 135 140	
	ggc aga gta tgc atc tcc ttg tac gcc tgg ttt gat tac aac atg ctg	480
45	Gly Arg Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu	
	145 150 155	
	cac cgc aag cat tgg gag cac cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag	528
	His Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys	
50	160 165 170 175	

	gac cct gac ttc cac agg gga aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc	576
	Asp Pro Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala	
	180 185 190	
5	agc ttc atg tcc agc tac atg tcg atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca	624
	Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala	
	195 200 205	
10	tgg tgg acg gtg gtc atg cag ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg	672
	Trp Trp Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu	
	210 215 220	
	ctg gtg ttc atg gcg gcc gcg ccc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc	720
15	Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe	
	225 230 235	
	tac ttt ggc acg tac atg ccc cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca	768
	Tyr Phe Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser	
20	240 245 250 255	
	ggc tct tca cca gcc gtc atg aac tgg tgg aag tcg cgc act agc cag	816
	Gly Ser Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln	
	260 265 270	
25	gcg tcc gac ctg gtc agc ttt ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac	864
	Ala Ser Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His	
	275 280 285	
30	tgg gag cac cac cgc tgg ccc ttc gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac	912
	Trp Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn	
	290 295 300	
	tgc cgc cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt cct gcc tag ctggacacac	961
35	Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala	
	305 310 315	
	tgccagtgggc cctgctgccca gctgggcatg cagggttgtgg caggactggg tgagggtgaaa	1021
40	agctgcaggc gctgctgccg gacacgttgc atgggctacc ctgtgtagct gccgccacta	1081
	ggggagggggg tttgtagctg tcgagcttgc	1111
45	<210> 25	
	<211> 315	
	<212> PRT	
50		

## 51

&lt;213&gt; Haematococcus pluvialis

5 &lt;400&gt; 25

Met Leu Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser  
 1 5 10 15

10

Asp Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu  
 20 25 30

15 Ser Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro  
 35 40 45

20 Ser Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp  
 50 55 60

25 Ala Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser  
 65 70 75 80

Leu Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu  
 85 90 95

30

Val Ser Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val  
 100 105 110

35 Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met  
 115 120 125

40 His Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly  
 130 135 140

45 Arg Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His  
 145 150 155 160

Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp  
 165 170 175

50

## 52

Pro Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser  
180 185 190

5 Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp  
195 200 205

10 Trp Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu  
210 215 220

15 Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr  
225 230 235 240

Phe Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly  
245 250 255

20 Ser Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala  
260 265 270

25 Ser Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp  
275 280 285

30 Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys  
290 295 300

35 Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala  
305 310 315

<210> 26

<211> 1031

40 <212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

45

<220>

<221> CDS

50

&lt;222&gt; (6)..(1031)

&lt;223&gt;

5

&lt;400&gt; 26

	gaagc atg cag cta gca gcg aca gta atg ttg gag cag ctt acc gga agc	50
	Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser	
10	1 5 10 15	
	gct gag gca ctc aag gag aag gag aag gag gtt gca ggc agc tct gac	98
	Ala Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp	
	20 25 30	
15	gtg ttg cgt aca tgg gcg acc cag tac tcg ctt ccg tca gag gag tca	146
	Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser	
	35 40 45	
20	gac gcg gcc cgc ccg gga ctg aag aat gcc tac aag cca cca cct tcc	194
	Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser	
	50 55 60	
25	gac aca aag ggc atc aca atg gcg cta gct gtc atc ggc tcc tgg gct	242
	Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala	
	65 70 75	
	gca gtg ttc ctc cac gcc att ttt caa atc aag ctt ccg acc tcc ttg	290
	Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu	
30	80 85 90 95	
	gac cag ctg cac tgg ctg ccc gtg tca gat gcc aca gct cag ctg gtt	338
	Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val	
	100 105 110	
35	agc ggc agc agc agc ctg ctg cac atc gtc gta gta ttc ttt gtc ctg	386
	Ser Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu	
	115 120 125	
40	gag ttc ctg tac aca ggc ctt ttt atc acc acg cat gat gct atg cat	434
	Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His	
	130 135 140	
	ggc acc atc gcc atg aga aac agg cag ctt aat gac ttc ttg ggc aga	482
45	Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg	
	145 150 155	
	gta tgc atc tcc ttg tac gcc tgg ttt gat tac aac atg ctg cac cgc	530
	Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg	
50	160 165 170 175	



## 54

	aag cat tgg gag cac cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag gac cct	578
	Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro	
	180 185 190	
5		
	gac ttc cac agg gga aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc agc ttc	626
	Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe	
	195 200 205	
10		
	atg tcc agc tac atg tcg atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca tgg tgg	674
	Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp	
	210 215 220	
	acg gtg gtc atg cag ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg ctg gtg	722
15	Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val	
	225 230 235	
	ttc atg gcg gcc gcg ccc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc tac ttt	770
	Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe	
20	240 245 250 255	
	ggc acg tac atg ccc cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca ggc tct	818
	Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser	
	260 265 270	
25		
	tca cca gcc gtc atg aac tgg tgg aag tcg cgc act agc cag gcg tcc	866
	Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser	
	275 280 285	
30		
	gac ctg gtc agc ttt ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac tgg gag	914
	Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu	
	290 295 300	
	cac cac cgc tgg ccc ttt gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc	962
35	His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg	
	305 310 315	
	cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt cct gcc gag caa aaa ctc atc tca	1010
	Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser	
40	320 325 330 335	
	gaa gag gat ctg aat agc tag	1031
	Glu Glu Asp Leu Asn Ser	
	340	
45		
	<210> 27	
	<211> 341	
50		

55

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Haematococcus pluvialis

5

&lt;400&gt; 27

10 Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala  
 1 5 10 15

15 Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val  
 20 25 30

20 Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp  
 35 40 45

25 Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp  
 50 55 60

30 Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala  
 65 70 75 80

35 Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp  
 85 90 95

40 Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser  
 100 105 110

45 Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu  
 115 120 125

50 Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly  
 130 135 140

55 Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val  
 145 150 155 160

60 Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys  
 165 170 175

His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp  
 180 185 190  
 5

Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met  
 195 200 205

10

Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr  
 210 215 220

15

Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe  
 225 230 235 240

20

Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly  
 245 250 255

25

Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser  
 260 265 270

30

Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp  
 275 280 285

35

Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His  
 290 295 300

40

His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg  
 305 310 315 320

Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu  
 325 330 335

45

Glu Asp Leu Asn Ser  
 340

<210> 28

<211> 777

50

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

5

<220>

<221> promoter

10

<222> (1) .. (777)

<223>

15

<400> 28

gagctcactc actgatttcc attgcttgaa aattgatgat gaactaagat caatccatgt 60

20

tagttttcaaa acaacagtaa ctgtggccaa cttagttttg aaacaacact aactgggtcga 120

agcaaaaaga aaaaagagtt tcatcatata tctgatttga tggactgttt ggagttagga 180

25

ccaaacatta tctacaaaca aagacttttc tcctaacttg tgattccttc ttaaacccta 240

ggggtaatat tctattttcc aaggatcttt agttaaaggc aaatccggga aattattgta 300

atcatttggg gaaacatata aaagatttga gttagatgga agtgacgatt aatccaaaca 360

30

tatatatctc tttcttctta tttcccaaat taacagacaa aagtagaata ttggctttta 420

acaccaatat aaaaacttgc ttcacaccta aacacttttg tttacttttag ggtaagtga 480

aaaagccaac caaatccacc tgcactgatt tgacgtttac aaacgccgtt aagtcgatgt 540

35

ccgttgattt aaacagtgtc ttgtaattaa aaaaatcagt ttacataaat ggaaaattta 600

tcacttagtt ttcacaaact tctgaactta cctttcatgg attaggcaat actttccatt 660

40

tttagtaact caagtggacc ctttacttct tcaactccat ctctctcttt ctatttcact 720

tctttcttct cattatatct cttgtcctct ccaccaaata tcttcaacaa aaagctt 777

45

<210> 29

<211> 22

<212> DNA

50

<213> kuenstlich

5 <220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(22)

10

<223>

15 <400> 29

gcaagctcga cagctacaaa cc

22

20

<210> 30

<211> 24

<212> DNA

25

<213> kuenstlich

30

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(24)

35

<223>

40

<400> 30

gaagcatgca gctagcagcg acag

24

45

<210> 31

<211> 30

<212> DNA

50

<213> kuenstlich

<220>

5 <221> primer\_bind

<222> (1)..(30)

<223>

10

<400> 31

tgcatgctag aggcaactcaa ggagaaggag

30

15

<210> 32

<211> 59

20

<212> DNA

<213> kuenstlich

25

<220>

<221> primer\_bind

30

<222> (1)..(59)

<223>

35

<400> 32

ctagctatttc agatcctctt ctgagatgag tttttgctcg gcaggaacca gacctcggc

59

40

<210> 33

<211> 28

45

<212> DNA

<213> kuenstlich

50

<220>  
<221> primer\_bind  
5 <222> (1)..(28)  
<223>  
  
10  
<400> 33  
gagctcactc actgatttcc attgcttg 28  
  
15 <210> 34  
<211> 37  
<212> DNA  
20 <213> kuenstlich  
  
25 <220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(37)  
30 <223>  
  
35 <400> 34  
cgccgttaag tcgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc 37  
  
40 <210> 35  
<211> 34  
<212> DNA  
45 <213> kuenstlich  
  
50 <220>

<221> primer\_bind  
<222> (1)..(34)  
5 <223>  
  
<400> 35  
10 atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac 34  
  
<210> 36  
15 <211> 25  
<212> DNA  
<213> kuenstlich  
20  
  
<220>  
25 <221> primer\_bind  
<222> (1)..(25)  
<223>  
30  
  
<400> 36  
35 taagcttttt gttgaagaga tttgg 25  
  
<210> 37  
<211> 212  
40 <212> DNA  
<213> Kuenstliche Sequenz  
45  
  
<220>  
<221> Intron  
50



&lt;222&gt; (1) .. (212)

&lt;223&gt;

5

&lt;400&gt; 37

gtcgactacg taagtttctg cttctacctt tgatatatat ataataatta tcattaatta 60

10 gtagtaatat aatatttcaa atattttttt caaaataaaa gaatgtagta tatagcaatt 120

gcttttctgt agtttataag tgtgtatatt ttaatttata acttttctaa tatatgacca 180

aaatttggtg atgtgcaggt atcaccggat cc 212

15

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 1830

20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Tagetes erecta

25

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

30

&lt;222&gt; (141) .. (1691)

&lt;223&gt;

35

&lt;400&gt; 38

ggcacgaggc aaagcaaagg ttgtttgttg ttgttggtga gagacactcc aatccaaaca 60

40 gatacaaggc gtgactggat atttctctct cgttcctaac aacagcaacg aagaagaaaa 120

agaatcatta ctaacaatca atg agt atg aga gct gga cac atg acg gca aca 173

Met Ser Met Arg Ala Gly His Met Thr Ala Thr

1

5

10

45

atg gcg gct ttt aca tgc cct agg ttt atg act agc atc aga tac acg 221

Met Ala Ala Phe Thr Cys Pro Arg Phe Met Thr Ser Ile Arg Tyr Thr

15

20

25

50 aag caa att aag tgc aac gct gct aaa agc cag cta gtc gtt aaa caa 269

## 63

	Lys	Gln	Ile	Lys	Cys	Asn	Ala	Ala	Lys	Ser	Gln	Leu	Val	Val	Lys	Gln	
	30							35					40				
5	gag	att	gag	gag	gaa	gaa	gat	tat	gtg	aaa	gcc	ggt	gga	tcg	gag	ctg	317
	Glu	Ile	Glu	Glu	Glu	Glu	Asp	Tyr	Val	Lys	Ala	Gly	Gly	Ser	Glu	Leu	
	45						50					55					
10	ctt	ttt	gtt	caa	atg	caa	cag	aat	aag	tcc	atg	gat	gca	cag	tct	agc	365
	Leu	Phe	Val	Gln	Met	Gln	Gln	Asn	Lys	Ser	Met	Asp	Ala	Gln	Ser	Ser	
	60					65				70					75		
15	cta	tcc	caa	aag	ctc	cca	agg	gta	cca	ata	gga	gga	gga	gga	gac	agt	413
	Leu	Ser	Gln	Lys	Leu	Pro	Arg	Val	Pro	Ile	Gly	Gly	Gly	Gly	Asp	Ser	
					80				85						90		
	aac	tgt	ata	ctg	gat	ttg	gtt	gta	att	ggg	tgt	ggg	cct	gct	ggc	ctt	461
	Asn	Cys	Ile	Leu	Asp	Leu	Val	Val	Ile	Gly	Cys	Gly	Pro	Ala	Gly	Leu	
				95					100					105			
20	gct	ctt	gct	gga	gaa	tca	gcc	aag	cta	ggc	ttg	aat	gtc	gca	ctt	atc	509
	Ala	Leu	Ala	Gly	Glu	Ser	Ala	Lys	Leu	Gly	Leu	Asn	Val	Ala	Leu	Ile	
				110				115					120				
25	ggc	cct	gat	ctt	cct	ttt	aca	aat	aac	tat	ggg	gtt	tgg	gag	gat	gaa	557
	Gly	Pro	Asp	Leu	Pro	Phe	Thr	Asn	Asn	Tyr	Gly	Val	Trp	Glu	Asp	Glu	
	125					130						135					
30	ttt	ata	ggg	ctt	gga	ctt	gag	ggc	tgt	att	gaa	cat	gtt	tgg	cga	gat	605
	Phe	Ile	Gly	Leu	Gly	Leu	Glu	Gly	Cys	Ile	Glu	His	Val	Trp	Arg	Asp	
	140					145				150						155	
35	act	gta	gta	tat	ctt	gat	gac	aac	gat	ccc	att	ctc	ata	ggg	cgt	gcc	653
	Thr	Val	Val	Tyr	Leu	Asp	Asp	Asn	Asp	Pro	Ile	Leu	Ile	Gly	Arg	Ala	
					160					165					170		
	tat	gga	cga	gtt	agt	cgt	gat	tta	ctt	cac	gag	gag	ttg	ttg	act	agg	701
	Tyr	Gly	Arg	Val	Ser	Arg	Asp	Leu	Leu	His	Glu	Glu	Leu	Leu	Thr	Arg	
				175				180						185			
40	tgc	atg	gag	tca	ggc	gtt	tca	tat	ctg	agc	tcc	aaa	gtg	gaa	cgg	att	749
	Cys	Met	Glu	Ser	Gly	Val	Ser	Tyr	Leu	Ser	Ser	Lys	Val	Glu	Arg	Ile	
				190				195					200				
45	act	gaa	gct	cca	aat	ggc	cta	agt	ctc	ata	gag	tgt	gaa	ggc	aat	atc	797
	Thr	Glu	Ala	Pro	Asn	Gly	Leu	Ser	Leu	Ile	Glu	Cys	Glu	Gly	Asn	Ile	
				205			210					215					
50	aca	att	cca	tgc	agg	ctt	gct	act	gtc	gct	tct	gga	gca	gct	tct	gga	845
	Thr	Ile	Pro	Cys	Arg	Leu	Ala	Thr	Val	Ala	Ser	Gly	Ala	Ala	Ser	Gly	
	220					225					230					235	

	aaa ctt ttg cag tat gaa ctt ggc ggt ccc cgt gtt tgc gtt caa aca	893
	Lys Leu Leu Gln Tyr Glu Leu Gly Gly Pro Arg Val Cys Val Gln Thr	
	240 245 250	
5		
	gct tat ggt ata gag gtt gag gtt gaa agc ata ccc tat gat cca agc	941
	Ala Tyr Gly Ile Glu Val Glu Val Glu Ser Ile Pro Tyr Asp Pro Ser	
	255 260 265	
10		
	cta atg gtt ttc atg gat tat aga gac tac acc aaa cat aaa tct caa	989
	Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp Tyr Thr Lys His Lys Ser Gln	
	270 275 280	
	tca cta gaa gca caa tat cca aca ttt ttg tat gtc atg cca atg tct	1037
15	Ser Leu Glu Ala Gln Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr Val Met Pro Met Ser	
	285 290 295	
	cca act aaa gta ttc ttt gag gaa act tgt ttg gct tca aaa gag gcc	1085
	Pro Thr Lys Val Phe Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys Glu Ala	
20	300 305 310 315	
	atg cct ttt gag tta ttg aag aca aaa ctc atg tca aga tta aag act	1133
	Met Pro Phe Glu Leu Leu Lys Thr Lys Leu Met Ser Arg Leu Lys Thr	
	320 325 330	
25		
	atg ggg atc cga ata acc aaa act tat gaa gag gaa tgg tca tat att	1181
	Met Gly Ile Arg Ile Thr Lys Thr Tyr Glu Glu Glu Trp Ser Tyr Ile	
	335 340 345	
30		
	cca gta ggt gga tcc tta cca aat acc gag caa aag aac ctt gca ttt	1229
	Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr Glu Gln Lys Asn Leu Ala Phe	
	350 355 360	
	ggt gct gct gct agc atg gtg cat cca gcc aca gga tat tcg gtt gta	1277
35	Gly Ala Ala Ala Ser Met Val His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val	
	365 370 375	
	aga tca ctg tca gaa gct cct aat tat gca gca gta att gca aag att	1325
	Arg Ser Leu Ser Glu Ala Pro Asn Tyr Ala Ala Val Ile Ala Lys Ile	
40	380 385 390 395	
	tta ggg aaa gga aat tca aaa cag atg ctt gat cat gga aga tac aca	1373
	Leu Gly Lys Gly Asn Ser Lys Gln Met Leu Asp His Gly Arg Tyr Thr	
	400 405 410	
45		
	acc aac atc tca aag caa gct tgg gaa aca ctt tgg ccc ctt gaa agg	1421
	Thr Asn Ile Ser Lys Gln Ala Trp Glu Thr Leu Trp Pro Leu Glu Arg	
	415 420 425	
50		
	aaa aga cag aga gca ttc ttt ctc ttt gga tta gca ctg att gtc cag	1469

## 65

Lys Arg Gln Arg Ala Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ala Leu Ile Val Gln  
 430 435 440

5 atg gat att gag ggg acc cgc aca ttc ttc cgg act ttc ttc cgc ttg 1517  
 Met Asp Ile Glu Gly Thr Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu  
 445 450 455

10 ccc aca tgg atg tgg tgg ggg ttt ctt gga tct tcg tta tca tca act 1565  
 Pro Thr Trp Met Trp Trp Gly Phe Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Thr  
 460 465 470 475

15 gac ttg ata ata ttt gcg ttt tac atg ttt atc ata gca ccg cat agc 1613  
 Asp Leu Ile Ile Phe Ala Phe Tyr Met Phe Ile Ile Ala Pro His Ser  
 480 485 490

ctg aga atg ggt ctg gtt aga cat ttg ctt tct gac ccg aca gga gga 1661  
 Leu Arg Met Gly Leu Val Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr Gly Gly  
 495 500 505

20 aca atg tta aaa gcg tat ctc acg ata taa ataactctag tcgcgatcag 1711  
 Thr Met Leu Lys Ala Tyr Leu Thr Ile  
 510 515

25 tttagattat aggcacatct tgcatatata tatgtataaa ccttatgtgt gctgtatcct 1771  
 tacatcaaca cagtcattaa ttgtatttct tggggtaatg ctgatgaagt attttctgg 1830

30 <210> 39  
 <211> 516  
 <212> PRT

35 <213> Tagetes erecta

40 <400> 39  
 Met Ser Met Arg Ala Gly His Met Thr Ala Thr Met Ala Ala Phe Thr  
 1 5 10 15

45 Cys Pro Arg Phe Met Thr Ser Ile Arg Tyr Thr Lys Gln Ile Lys Cys  
 20 25 30

50 Asn Ala Ala Lys Ser Gln Leu Val Val Lys Gln Glu Ile Glu Glu Glu  
 35 40 45

	Glu	Asp	Tyr	Val	Lys	Ala	Gly	Gly	Ser	Glu	Leu	Leu	Phe	Val	Gln	Met	
	50						55					60					
5																	
	Gln	Gln	Asn	Lys	Ser	Met	Asp	Ala	Gln	Ser	Ser	Leu	Ser	Gln	Lys	Leu	
	65					70					75					80	
10																	
	Pro	Arg	Val	Pro	Ile	Gly	Gly	Gly	Gly	Asp	Ser	Asn	Cys	Ile	Leu	Asp	
					85					90					95		
15																	
	Leu	Val	Val	Ile	Gly	Cys	Gly	Pro	Ala	Gly	Leu	Ala	Leu	Ala	Gly	Glu	
				100					105					110			
20																	
	Ser	Ala	Lys	Leu	Gly	Leu	Asn	Val	Ala	Leu	Ile	Gly	Pro	Asp	Leu	Pro	
			115					120					125				
25																	
	Phe	Thr	Asn	Asn	Tyr	Gly	Val	Trp	Glu	Asp	Glu	Phe	Ile	Gly	Leu	Gly	
	130					135						140					
30																	
	Leu	Glu	Gly	Cys	Ile	Glu	His	Val	Trp	Arg	Asp	Thr	Val	Val	Tyr	Leu	
	145					150					155					160	
35																	
	Asp	Asp	Asn	Asp	Pro	Ile	Leu	Ile	Gly	Arg	Ala	Tyr	Gly	Arg	Val	Ser	
					165					170					175		
40																	
	Arg	Asp	Leu	Leu	His	Glu	Glu	Leu	Leu	Thr	Arg	Cys	Met	Glu	Ser	Gly	
				180					185					190			
45																	
	Val	Ser	Tyr	Leu	Ser	Ser	Lys	Val	Glu	Arg	Ile	Thr	Glu	Ala	Pro	Asn	
			195					200					205				
50																	
	Gly	Leu	Ser	Leu	Ile	Glu	Cys	Glu	Gly	Asn	Ile	Thr	Ile	Pro	Cys	Arg	
	210						215					220					
55																	
	Leu	Ala	Thr	Val	Ala	Ser	Gly	Ala	Ala	Ser	Gly	Lys	Leu	Leu	Gln	Tyr	
	225					230					235					240	

## 67

	Glu	Leu	Gly	Gly	Pro	Arg	Val	Cys	Val	Gln	Thr	Ala	Tyr	Gly	Ile	Glu	
					245					250					255		
5	Val	Glu	Val	Glu	Ser	Ile	Pro	Tyr	Asp	Pro	Ser	Leu	Met	Val	Phe	Met	
				260					265					270			
10	Asp	Tyr	Arg	Asp	Tyr	Thr	Lys	His	Lys	Ser	Gln	Ser	Leu	Glu	Ala	Gln	
		275						280					285				
15	Tyr	Pro	Thr	Phe	Leu	Tyr	Val	Met	Pro	Met	Ser	Pro	Thr	Lys	Val	Phe	
		290					295					300					
20	Phe	Glu	Glu	Thr	Cys	Leu	Ala	Ser	Lys	Glu	Ala	Met	Pro	Phe	Glu	Leu	
	305					310					315				320		
25	Leu	Lys	Thr	Lys	Leu	Met	Ser	Arg	Leu	Lys	Thr	Met	Gly	Ile	Arg	Ile	
					325					330					335		
30	Thr	Lys	Thr	Tyr	Glu	Glu	Glu	Trp	Ser	Tyr	Ile	Pro	Val	Gly	Gly	Ser	
				340					345					350			
35	Leu	Pro	Asn	Thr	Glu	Gln	Lys	Asn	Leu	Ala	Phe	Gly	Ala	Ala	Ala	Ser	
		355						360				365					
40	Met	Val	His	Pro	Ala	Thr	Gly	Tyr	Ser	Val	Val	Arg	Ser	Leu	Ser	Glu	
		370					375					380					
45	Ala	Pro	Asn	Tyr	Ala	Ala	Val	Ile	Ala	Lys	Ile	Leu	Gly	Lys	Gly	Asn	
	385				390					395					400		
50	Ser	Lys	Gln	Met	Leu	Asp	His	Gly	Arg	Tyr	Thr	Thr	Asn	Ile	Ser	Lys	
				405					410					415			
55	Gln	Ala	Trp	Glu	Thr	Leu	Trp	Pro	Leu	Glu	Arg	Lys	Arg	Gln	Arg	Ala	
			420					425						430			
60	Phe	Phe	Leu	Phe	Gly	Leu	Ala	Leu	Ile	Val	Gln	Met	Asp	Ile	Glu	Gly	
		435					440						445				

Thr Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu Pro Thr Trp Met Trp  
 450 455 460  
 5

Trp Gly Phe Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Thr Asp Leu Ile Ile Phe  
 465 470 475 480

10

Ala Phe Tyr Met Phe Ile Ile Ala Pro His Ser Leu Arg Met Gly Leu  
 485 490 495

15 Val Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr Gly Gly Thr Met Leu Lys Ala  
 500 505 510

Tyr Leu Thr Ile  
 20 515

<210> 40

25 <211> 445

<212> DNA

<213> Tagetes erecta

30

<220>

35 <221> Sense Fragment

<222> (1) .. (445)

<223>

40

<400> 40  
 aagcttgcac gaggcaaagc aaaggttggtt tggttggtggt gttgagagac actccaatcc 60  
 45 aaacagatac aaggcgtgac tggatatttc tctctcgttc ctaacaacag caacgaagaa 120  
 gaaaaagaat cattactaac aatcaatgag tatgagagct ggacacatga cggcaacaat 180  
 50 ggcggttttt acatgcccta ggtttatgac tagcatcaga tacacgaagc aaattaagtg 240

	caacgctgct aaaagccagc tagtcgttaa acaagagatt gaggaggaag aagattatgt	300
5	gaaagccggt ggatcggagc tgctttttgt tcaaagcaa cagaataagt ccatggatgc	360
	acagtctagc ctatcccaaa agctcccaag ggtaccaata ggaggaggag gagacagtaa	420
	ctgtatactg gatttggttg tcgac	445
10	<210> 41	
	<211> 446	
15	<212> DNA	
	<213> Tagetes erecta	
20	<220>	
	<221> Antisense Fragment	
25	<222> (1) .. (446)	
	<223>	
30	<400> 41	
	gaattcgcac gaggcaaagc aaagggtgtt tggtgtgtt gttgagagac actccaatcc	60
	aaacagatac aaggcgtgac tggatatttc tctctcgttc ctaacaacag caacgaagaa	120
35	gaaaaagaat cattactaac aatcaatgag tatgagagct ggacacatga cggcaacaat	180
	ggcggctttt acatgcccta ggtttatgac tagcatcaga tacacgaagc aaattaagtg	240
40	caacgctgct aaaagccagc tagtcgttaa acaagagatt gaggaggaag aagattatgt	300
	gaaagccggt ggatcggagc tgctttttgt tcaaagcaa cagaataagt ccatggatgc	360
	acagtctagc ctatcccaaa agctcccaag ggtaccaata ggaggaggag gagacagtaa	420
45	ctgtatactg gatttggttg gaccc	446
	<210> 42	
50		



<211> 393

<212> DNA

5 <213> Tagetes erecta

<220>

10 <221> Sense Fragment

<222> (1)..(393)

15 <223>

<400> 42

20 aagcttttggga ttagcactga ttgtccagat ggatattgag gggacccgca cattcttccg 60

gactttcttc cgcttgccca catggatgtg gtggggggtt cttggatctt cgttatcatc 120

aactgacttg ataatatttg cgttttacat gtttatcata gcaccgcata gcttgagaat 180

25 ggggtctgggt agacatttgc tttctgaccc gacaggagga acaatgttaa aagcgtatct 240

cacgatataa ataactctag tcgcgatcag tttagattat aggcacatct tgcatatata 300

30 tatgtataaa ccttatgtgt gctgtatcct tacatcaaca cagtcattaa ttgtatttct 360

tggggtaatg ctgatgaagt attttctgtc gac 393

35 <210> 43

<211> 397

<212> DNA

40 <213> Tagetes erecta

<220>

<221> Antisense Fragment

<222> (1)..(397)

50

&lt;223&gt;

5 <400> 43  
gaattctctt tggattagca ctgattgtcc agatggatat tgagggggacc cgcacattct 60  
tccggacttt cttccgcttg cccacatgga tgtggtgggg gtttcttgga tcttcgttat 120  
10 catcaactga cttgataata ttgctgtttt acatgtttat catagcaccg catagcctga 180  
gaatgggtct ggtagacat ttgctttctg acccgacagg aggaacaatg ttaaaagcgt 240  
atctcagcat ataaataact ctagtgcga tcagtttaga ttataggcac atcttgcata 300  
15 tatatatgta taaaccttat gtgtgctgta tccttacatc aacacagtca ttaattgtat 360  
ttcttggggg aatgctgatg aagtattttc tggatcc 397

20  
<210> 44  
<211> 1537

25 <212> DNA  
<213> -

30  
<220>  
<221> promoter

35 <222> (1) .. (1537)  
<223>

40  
<400> 44  
gagctctaca aattaggggt actttattca ttttcatcca ttctctttat tgttaaattt 60  
tgtacattta ttcaataata ttatatgttt attacaaatt ctcactttct tattcatacc 120  
45 tattcactca agcctttacc atcttccttt tctatttcaa tactatttct acttcatttt 180  
tcacgttttt aacatctttc tttatttctt gtccacttcg tttagggatg cctaagtgcc 240  
50 caaatttcat ctctcgtagt aacacaaaac caatgtaatg ctacttctct ctacattttt 300

5 aatacaaaata aagtgaaaca aaatatctat aaataaaca atatatatat ttgttagac 360  
gctgtctcaa cccatcaatt aaaaaatttt gttatatattc tactttacct actaaatttg 420  
tttctcatat ttacctttta acccccacaa aaaaaaatta taaaaaagaa agaaaaaagc 480  
taaaccctat ttaaatagct aactataaga tcttaaaatt atcctcatca gtgtatagtt 540  
10 taattgggta ttaacttata acattatata tctatgacat atactctctc ctagctattt 600  
ctcacatttt ttaacttaag aaaatagtca taacatagtc taaaattcaa acatccacat 660  
gctctaattt gattaacaaa aagttagaaa tatttattta aataaaaaag actaataaat 720  
15 atataaaatg aatgttcata cgcagacca tttagagatg agtatgcttt cacatgctga 780  
gattattttc aaaactaagg ttgtagcaat attaaatcaa taaaattatt ataaataaca 840  
20 aaattaacct gctcgtgttt gctgtatatg ggaggctaca aaataaatta aactaaagat 900  
gattatgttt tagacatttt ttctatctgt attagtttat acatattaat tcaggagctg 960  
cacaacccaa ttctattttc gttccttggt ggctgggttt ctcaacagg tcaatagtca 1020  
25 atattagggt ttattggact tttaatagta tcaacaaat ctatgtgtga acttaaaaat 1080  
tgtattaaat atttagggta acctgttgcc gtttttagaa taatgtttct tcttaataca 1140  
30 cgaaagcgta ttgtgtattc attcatttgg cgcctcacat gcttcggttg gctcgttta 1200  
gtctctgcct tctttgtata ttgtactccc cctcttccta tgccacgtgt tctgagctta 1260  
acaagccacg ttgcgtgcca ttgccaaaca agtcatttta acttcacaag gtccgatttg 1320  
35 acctccaaaa caacgacaag tttccgaaca gtcgcaaga tcaagggtat aatcgtcttt 1380  
ttgaattcta tttctcttta tttaatagtc cctctcgtgt gatagttttt aaaagatttt 1440  
40 taaaacgtag ctgctgttta agtaaatccc agtccttcag tttgtgcttt tgtgtgtttt 1500  
gtttctctga ttacggaat ttggaaataa taagctt 1537

45 <210> 45

<211> 734

<212> DNA

50

<213> kuenstliche Sequenz

5 <220>

<221> variation

10 <222> (1) .. (734)

<223>

15 <400> 45  
 ctaacaatca atgagtagag agctggacac atgacggcaa caatggcggc ttttacatgc 60  
 cctagggttta tgactagcat cagatacacg aagcaaatta agtgcaacgc tgctaaaagc 120  
 20 cagctagtcg ttaaacaaga gattgaggag gaagaagatt atgtgaaagc cggtaggatcg 180  
 gagctgcttt ttgttcaaat gcaacagaat aagtccatgg atgcacagtc tagcctatcc 240  
 caaaagggtca ctccagactt aattgcttat aaataaataa atatgttttt taggaataat 300  
 25 gatattttaga tagattagct atcacctgtg ctgtgggtgtg cagctcccaa gggctcttacc 360  
 gatagtaaaa tcgttagtta tgattaatac ttgggagggtg ggggattata ggctttgttg 420  
 30 tgagaatggt gagaaagagg ttgacaaat cgggtgtttga atgaggttaa atggagttta 480  
 attaaaataa agagaagaga aagattaaga gggtagatgg gatattaaag acggscaata 540  
 tagtgatgcc acgtagaaaa aggtaagtga aaacatacaa cgtggcttta aaagatggct 600  
 35 tggctgctaa tcaactcaac tcaactcata tcctatccat tcaaattcaa ttcaattcta 660  
 ttgaatgcaa agcaaagcaa aggttggttg ttgttggtgt tgagagacac tccaatccaa 720  
 40 acagatacaa ggcg 734

<210> 46

45 <211> 280

<212> DNA

50 <213> kuenstliche Sequenz

<220>

5 <221> variation

<222> (1)..(280)

<223>

10

<400> 46

15 gtcgagtatg gagttcaatt aaaataaaga gaagaraaag attaagaggg tgatggggat 60

attaaagacg gccaatrtag tgatgccacg taagaaaaag gtaagtgaaa acatacaacg 120

tggttttaaa agatggcttg gctgctaatac aactcaactc aactcatatc ctatccattc 180

20 aaattcaatt caattctatt gaatgcaaag caaagcaaag caaaggttgt ttgttgttgt 240

tgttgagaga cactccaatac caaacagata caaggcgtga 280

25 <210> 47

<211> 358

<212> DNA

30 <213> *Tagetes erecta*

35 <220>

<221> Sense Promotor

<222> (1)..(358)

40 <223>

<400> 47

45 aagcttaccg atagtaaaat cgttagtatt gattaatact tgggaggtgg gggattatag 60

gctttgttgt gagaatgttg agaaagaggt ttgacaaatac ggtgtttgaa tgagggttaaa 120

50 tggagtttaa ttaaaataaa gagaagagaa agattaagag ggtgatgggg atattaaaga 180

## 75

cggccaatat agtgatgcc a ctagaaaaa ggtaagtga aacatacaac gtggctttaa 240  
aagatggctt ggctgcta at caactcaact caactcatat cctatccatt caaattcaat 300  
5 tcaattctat tgaatgcaa gcaaagcaa gcaaagggtt tttgttggtt ttgtcgac 358

<210> 48  
10 <211> 361  
<212> DNA  
15 <213> *Tagetes erecta*

<220>  
20 <221> Antisense Promotor  
<222> (1)..(361)  
25 <223>

<400> 48  
30 ctcgagctta ccgatagtaa aatcgtagt tatgattaat acttgggagg tgggggatta 60  
taggctttgt tgtgagaatg ttgagaaaga ggtttgacaa atcgggtgtt gaatgagggt 120  
aaatggagtt taattaaaat aaagagaaga gaaagattaa gagggatgat gggatattaa 180  
35 agacggccaa tatagtgatg ccacgtagaa aaaggtaagt gaaaacatac aacgtggctt 240  
taaaagatgg cttggctgct aatcaactca actcaactca taccctatcc attcaaattc 300  
40 aattcaattc tattgaatgc aaagcaaagc aaagcaaagg ttgtttgttg ttgttggatc 360  
c 361

<210> 49  
45 <211> 28  
<212> DNA  
50

<213> kuenstliche Sequenz

5 <220>

<221> Primer

<222> (1) .. (28)

10 <223>

15 <400> 49  
gagctcactc actgatttcc attgcttg 28

<210> 50

20 <211> 37

<212> DNA

25 <213> kuenstliche Sequenz

<220>

30 <221> Primer

<222> (1) .. (37)

35 <223>

<400> 50

40 cgccgttaag tcgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc 37

<210> 51

45 <211> 34

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

50

<220>

5 <221> Primer

<222> (1)..(34)

<223>

10

<400> 51  
atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac 34

15

<210> 52

<211> 25

20 <212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

25

<220>

<221> Primer

30 <222> (1)..(25)

<223>

35

<400> 52  
taagcttttt gttgaagaga tttgg 25

40

<210> 53

<211> 23

45 <212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

50



	<220>	
	<221> Primer	
5	<222> (1) .. (23)	
	<223>	
10		
	<400> 53	
	gaaaataactt catcagcatt acc	23
15	<210> 54	
	<211> 28	
	<212> DNA	
20	<213> kuenstliche Sequenz	
25	<220>	
	<221> Primer	
	<222> (1) .. (28)	
30	<223>	
35	<400> 54	
	gtcgactacg taagtttctg cttctacc	28
40	<210> 55	
	<211> 26	
	<212> DNA	
45	<213> kuenstliche Sequenz	
50	<220>	

<221> Primer

<222> (1)..(26)

5 <223>

<400> 55  
10 ggatccggtg atacctgcac atcaac 26

<210> 56

15 <211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz  
20

<220>

25 <221> Primer

<222> (1)..(28)

<223>  
30

<400> 56  
35 aagcttgcac gaggcaaagc aaagggttg 28

<210> 57

<211> 29

40 <212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

45

<220>

<221> Primer  
50

<222> (1) .. (29)

<223>

5

<400> 57

gtcgacaacc aaatccagta tacagttac

29

10

<210> 58

<211> 30

15

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

20

<220>

<221> Primer

25

<222> (1) .. (30)

<223>

30

<400> 58

aggatccaac caaatccagt atacagttac

30

35

<210> 59

<211> 28

<212> DNA

40

<213> kuenstliche Sequenz

45

<220>

<221> Primer

<222> (1) .. (28)

50

<223>

5 <400> 59  
gaattcgcac gaggcaaagc aaagggttg

28

10 <210> 60

<211> 25

<212> DNA

15 <213> kuenstliche Sequenz

20 <220>

<221> Primer

<222> (1)..(25)

25 <223>

30 <400> 60  
aagcttttgga ttagcactga ttgtc

25

<210> 61

35 <211> 29

<212> DNA

40 <213> kuenstliche Sequenz

<220>

45 <221> Primer

<222> (1)..(29)

50 <223>

5           <400> 61  
            gtcgcacagaa aatacttcat cagcattac 29

10           <210> 62  
            <211> 29  
            <212> DNA  
            <213> kuenstliche Sequenz

15           <220>  
            <221> Primer  
20           <222> (1) .. (29)  
            <223>

25           <400> 62  
            ggatccagaa aatacttcat cagcattac 29

30           <210> 63  
            <211> 27  
35           <212> DNA  
            <213> kuenstliche Sequenz

40           <220>  
            <221> Primer  
45           <222> (1) .. (27)  
            <223>

50

<400> 63  
gaattctctt tggattagca ctgattg

27

5 <210> 64

<211> 23

<212> DNA

10

<213> kuenstliche Sequenz

15 <220>

<221> Primer

<222> (1)..(23)

20

<223>

25 <400> 64  
cgccttgtat ctgtttggat tgg

23

30 <210> 65

<211> 24

<212> DNA

35 <213> kuenstliche Sequenz

40 <220>

<221> Primer

<222> (1)..(24)

45 <223>

50 <400> 65  
ctaacaatca atgagtatga gagc

24

<210> 66  
5 <211> 26  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz  
10  
  
<220>  
15 <221> Primer  
<222> (1) .. (26)  
<223>  
20  
  
<400> 66  
25 agagcaaggc cagcaggacc acaacc  
  
<210> 67  
<211> 26  
30 <212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz  
35  
  
<220>  
<221> Primer  
40 <222> (1) .. (26)  
<223>  
45  
  
<400> 67  
50 ccttgggagc ttttgggata ggctag

26

26

<210> 68

<211> 26

5 <212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

10

<220>

<221> Primer

15 <222> (1)..(26)

<223>

20

<400> 68  
tcacgccttg tatctgtttg gattgg 26

25 <210> 69

<211> 15

<212> DNA

30 <213> kuenstliche Sequenz

35 <220>

<221> Primer

<222> (1)..(15)

40 <223>

45 <400> 69  
gtcgagtatg gagtt 15

50 <210> 70



<211> 28

<212> DNA

5 <213> kuenstliche Sequenz

<220>

10

<221> Primer

<222> (1) .. (28)

15 <223>

<400> 70

20 aagcttaccg atagtaaaat cgtaggtt

28

<210> 71

25 <211> 31

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

30

<220>

35 <221> Primer

<222> (1) .. (31)

<223>

40

<400> 71

45 ctcgagctta ccgataagtaa aatcgtagt t

31

<210> 72

<211> 28

50

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

5

<400> 72

gtcgacaaca acaacaaaca acctttgc

28

10

<210> 73

<211> 28

15

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

20

<220>

<221> Primer

25

<222> (1) .. (28)

<223>

30

<400> 73

ggatccaaca acaacaaaca acctttgc

28

35

<210> 74

<211> 28

<212> DNA

40

<213> kuenstliche Sequenz

45

<220>

<221> Primer

<222> (1) .. (28)

50

<223>

5 <400> 74  
gtcgaactttt tgttgaagag atttggtg

28

10 <210> 75  
<211> 28

<212> DNA

15 <213> kuenstliche Sequenz

20 <220>  
<221> Primer  
<222> (1) .. (28)

25 <223>

30 <400> 75  
ctcgagactc actgatttcc attgcttg

28

<210> 76  
35 <211> 22

<212> DNA

40 <213> kuenstliche Sequenz

<220>  
45 <221> Primer  
<222> (1) .. (22)

50 <223>

5           <400> 76  
            gagctctaca aattaggggtt ac 22

10           <210> 77

            <211> 23

            <212> DNA

            <213> kuenstliche Sequenz

15           <220>

            <221> Primer

20           <222> (1)..(23)

            <223>

25           <400> 77

            aagcttatta tttccaaatt ccg 23

30           <210> 78

            <211> 50

35           <212> DNA

            <213> kuenstliche Sequenz

40           <220>

            <221> Primer

45           <222> (1)..(50)

            <223>

50

	<400> 78	
	aagcttttgca attcatacag aagtgagaaa aatgcagcta gcagcgacag	50
5	<210> 79	
	<211> 1062	
	<212> DNA	
10	<213> Haematococcus pluvialis	
15	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (32)..(1021)	
20	<223>	
25	<400> 79	
	aagcttttgca attcatacag aagtgagaaa a atg cag cta gca gcg aca gta	52
	Met Gln Leu Ala Ala Thr Val	
	1 5	
30	atg ttg gag cag ctt acc gga agc gct gag gca ctc aag gag aag gag	100
	Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu	
	10 15 20	
35	aag gag gtt gca ggc agc tct gac gtg ttg cgt aca tgg gcg acc cag	148
	Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln	
	25 30 35	
40	tac tcg ctt ccg tca gag gag tca gac gcg gcc cgc ccg gga ctg aag	196
	Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys	
	40 45 50 55	
45	aat gcc tac aag cca cca cct tcc gac aca aag ggc atc aca atg gcg	244
	Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala	
	60 65 70	
	cta gct gtc atc ggc tcc tgg gcc gca gtg ttc ctc cac gcc att ttt	292
	Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe	
	75 80 85	
50	caa atc aag ctt ccg acc tcc ttg gac cag ctg cac tgg ctg ccc gtg	340

## 91

	Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val	
	90 95 100	
5	tca gat gcc aca gct cag ctg gtt agc ggc agc agc agc ctg ctg cac Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser Gly Ser Ser Ser Leu Leu His	388
	105 110 115	
10	atc gtc gta gta ttc ttt gtc ctg gag ttc ctg tac aca ggc ctt ttt Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe	436
	120 125 130 135	
15	atc acc acg cat gat gct atg cat ggc acc atc gcc atg aga aac agg Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg	484
	140 145 150	
	cag ctt aat gac ttc ttg ggc aga gta tgc atc tcc ttg tac gcc tgg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp	532
	155 160 165	
20	ttt gat tac aac atg ctg cac cgc aag cat tgg gag cac cac aac cac Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys His Trp Glu His His Asn His	580
	170 175 180	
25	act ggc gag gtg ggc aag gac cct gac ttc cac agg gga aac cct ggc Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly	628
	185 190 195	
30	att gtg ccc tgg ttt gcc agc ttc atg tcc agc tac atg tcg atg tgg Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp	676
	200 205 210 215	
35	cag ttt gcg cgc ctc gca tgg tgg acg gtg gtc atg cag ctg ctg ggt Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly	724
	220 225 230	
	gcg cca atg gcg aac ctg ctg gtg ttc atg gcg gcc gcg ccc atc ctg Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu	772
	235 240 245	
40	tcc gcc ttc cgc ttg ttc tac ttt ggc acg tac atg ccc cac aag cct Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro	820
	250 255 260	
45	gag cct ggc gcc gcg tca ggc tct tca cca gcc gtc atg aac tgg tgg Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp	868
	265 270 275	
50	aag tcg cgc act agc cag gcg tcc gac ctg gtc agc ttt ctg acc tgc Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys	916
	280 285 290 295	

tac cac ttc gac ctg cac tgg gag cac cac cgc tgg ccc ttt gcc ccc 964  
 Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro  
 300 305 310  
 5  
 tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt 1012  
 Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val  
 315 320 325  
 10 cct gcc tag ctggacacac tgcagtgggc cctgctgcca gctgggcatg c 1062  
 Pro Ala  
 15 <210> 80  
 <211> 329  
 <212> PRT  
 20 <213> Haematococcus pluvialis  
 25 <400> 80  
 Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala  
 1 5 10 15  
 30  
 Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val  
 20 25 30  
 35 Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp  
 35 40 45  
 40 Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp  
 50 55 60  
 Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala  
 65 70 75 80  
 45  
 Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp  
 85 90 95  
 50

## 93

	Gln	Leu	His	Trp	Leu	Pro	Val	Ser	Asp	Ala	Thr	Ala	Gln	Leu	Val	Ser	
					100				105					110			
5	Gly	Ser	Ser	Ser	Leu	Leu	His	Ile	Val	Val	Val	Phe	Phe	Val	Leu	Glu	
					115			120						125			
10	Phe	Leu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Phe	Ile	Thr	Thr	His	Asp	Ala	Met	His	Gly	
		130						135					140				
15	Thr	Ile	Ala	Met	Arg	Asn	Arg	Gln	Leu	Asn	Asp	Phe	Leu	Gly	Arg	Val	
	145					150					155				160		
20	Cys	Ile	Ser	Leu	Tyr	Ala	Trp	Phe	Asp	Tyr	Asn	Met	Leu	His	Arg	Lys	
					165					170					175		
25	His	Trp	Glu	His	His	Asn	His	Thr	Gly	Glu	Val	Gly	Lys	Asp	Pro	Asp	
					180				185					190			
30	Phe	His	Arg	Gly	Asn	Pro	Gly	Ile	Val	Pro	Trp	Phe	Ala	Ser	Phe	Met	
					195			200					205				
35	Ser	Ser	Tyr	Met	Ser	Met	Trp	Gln	Phe	Ala	Arg	Leu	Ala	Trp	Trp	Thr	
		210					215					220					
40	Val	Val	Met	Gln	Leu	Leu	Gly	Ala	Pro	Met	Ala	Asn	Leu	Leu	Val	Phe	
	225					230					235				240		
45	Met	Ala	Ala	Ala	Pro	Ile	Leu	Ser	Ala	Phe	Arg	Leu	Phe	Tyr	Phe	Gly	
					245					250				255			
50	Thr	Tyr	Met	Pro	His	Lys	Pro	Glu	Pro	Gly	Ala	Ala	Ser	Gly	Ser	Ser	
					260				265					270			
55	Pro	Ala	Val	Met	Asn	Trp	Trp	Lys	Ser	Arg	Thr	Ser	Gln	Ala	Ser	Asp	
					275			280					285				
60	Leu	Val	Ser	Phe	Leu	Thr	Cys	Tyr	His	Phe	Asp	Leu	His	Trp	Glu	His	
		290					295					300					



His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg  
 305 310 315 320  
 5  
 Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala  
 325  
 10  
 <210> 81  
 <211> 831  
 15 <212> DNA  
 <213> Haematococcus pluvialis  
 20  
 <220>  
 <221> CDS  
 25 <222> (1) .. (831)  
 <223>  
 30  
 <400> 81  
 atg cca tcc gag tcg tca gac gca gct cgt cct gtg ttg aag cac gcc 48  
 Met Pro Ser Glu Ser Ser Asp Ala Ala Arg Pro Val Leu Lys His Ala  
 1 5 10 15  
 35  
 tat aaa cct cca gca tct gac gcc aag ggc atc act atg gcg ctg acc 96  
 Tyr Lys Pro Pro Ala Ser Asp Ala Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Thr  
 20 25 30  
 40  
 atc att ggc acc tgg acc gca gtg ttt tta cac gca ata ttc caa atc 144  
 Ile Ile Gly Thr Trp Thr Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile  
 35 40 45  
 45  
 agg cta ccg aca tcc atg gac cag ctt cac tgg ttg cct gtg tcc gaa 192  
 Arg Leu Pro Thr Ser Met Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Glu  
 50 55 60  
 gcc aca gcc cag ctg ttg ggc gga agc agc agc cta ttg cac atc gcc 240  
 Ala Thr Ala Gln Leu Leu Gly Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Ala  
 50 65 70 75 80

## 95

	gca gtc ttc att gta ctt gag ttt ctg tac act ggt cta ttc atc acc	288
	Ala Val Phe Ile Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr	
	85 90 95	
5	acg cat gat gca atg cat ggc acc ata gct ttg agg aac agg cag ctc	336
	Thr His Asp Ala Met His Gly Thr Ile Ala Leu Arg Asn Arg Gln Leu	
	100 105 110	
10	aat gat ctc ctt ggc aac atc tgc ata tca ctg tac gcc tgg ttt gac	384
	Asn Asp Leu Leu Gly Asn Ile Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp	
	115 120 125	
15	tac agc atg cac tgg gag cac cac aac cat act ggc gaa gtg ggg aaa	432
	Tyr Ser Met His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys	
	130 135 140	
20	gac cct gac ttc cac aaa gga aat cct ggc ctt gtc ccc tgg ttc gcc	480
	Asp Pro Asp Phe His Lys Gly Asn Pro Gly Leu Val Pro Trp Phe Ala	
	145 150 155 160	
25	agc ttc atg tcc agc tac atg tcc ctg tgg cag ttt gcc cgg ctg gca	528
	Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Leu Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala	
	165 170 175	
30	tgg tgg gca gtg gtg atg caa acg ttg ggg gcc ccc atg gcg aat ctc	576
	Trp Trp Ala Val Val Met Gln Thr Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu	
	180 185 190	
35	cta gtc ttc atg gct gca gcc cca atc ttg tca gca ttc cgc ctc ttc	624
	Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe	
	195 200 205	
40	tac ttc ggc act tac ctg cca cac aag cct gag cca ggc cct gca gca	672
	Tyr Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Pro Ala Ala	
	210 215 220	
45	ggc tct cag gtc atg tct tgg ttc agg gcc aag aca agt gag gca tct	720
	Gly Ser Gln Val Met Ser Trp Phe Arg Ala Lys Thr Ser Glu Ala Ser	
	225 230 235 240	
50	gat gtg atg agc ttc ctg aca tgc tac cac ttt gac ctg ttt gcc ccc	768
	Asp Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu Phe Ala Pro	
	245 250 255	
55	tgg tgg cag ctg ccc cac tgc cgc cgc ctg tct ggg cgt ggc ctg gtg	816
	Trp Trp Gln Leu Pro His Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val	
	260 265 270	
60	cct gcc ttg gca tga	831

Pro Ala Leu Ala  
275

5 <210> 82

<211> 276

<212> PRT

10

<213> Haematococcus pluvialis

15 <400> 82

Met Pro Ser Glu Ser Ser Asp Ala Ala Arg Pro Val Leu Lys His Ala  
1 5 10 15

20

Tyr Lys Pro Pro Ala Ser Asp Ala Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Thr  
20 25 30

25

Ile Ile Gly Thr Trp Thr Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile  
35 40 45

30

Arg Leu Pro Thr Ser Met Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Glu  
50 55 60

35

Ala Thr Ala Gln Leu Leu Gly Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Ala  
65 70 75 80

Ala Val Phe Ile Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr  
85 90 95

40

Thr His Asp Ala Met His Gly Thr Ile Ala Leu Arg Asn Arg Gln Leu  
100 105 110

45

Asn Asp Leu Leu Gly Asn Ile Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp  
115 120 125

50

Tyr Ser Met His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys  
130 135 140

5      Asp Pro Asp Phe His Lys Gly Asn Pro Gly Leu Val Pro Trp Phe Ala  
       145                                150                                155                                160

Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Leu Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala  
    165                                170                                175

10      Trp Trp Ala Val Val Met Gln Thr Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu  
    180                                185                                190

15      Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe  
    195                                200                                205

20      Tyr Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Pro Ala Ala  
    210                                215                                220

25      Gly Ser Gln Val Met Ser Trp Phe Arg Ala Lys Thr Ser Glu Ala Ser  
    225                                230                                235                                240

Asp Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu Phe Ala Pro  
    245                                250                                255

30      Trp Trp Gln Leu Pro His Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val  
    260                                265                                270

35      Pro Ala Leu Ala  
    275

40      <210>    83  
             <211>    729  
             <212>    DNA

45      <213>    Paracoccus sp. MBIC1143

50      <220>

<221> CDS

<222> (1) .. (729)

5      <223>

<400> 83

10	atg	agc	gca	cat	gcc	ctg	ccc	aag	gca	gat	ctg	acc	gcc	acc	agc	ctg	48
	Met	Ser	Ala	His	Ala	Leu	Pro	Lys	Ala	Asp	Leu	Thr	Ala	Thr	Ser	Leu	
	1				5				10						15		
15	atc	gtc	tcg	ggc	ggc	atc	atc	gcc	gct	tgg	ctg	gcc	ctg	cat	gtg	cat	96
	Ile	Val	Ser	Gly	Gly	Ile	Ile	Ala	Ala	Trp	Leu	Ala	Leu	His	Val	His	
				20				25						30			
20	gcg	ctg	tgg	ttt	ctg	gac	gca	gcg	gcg	cat	ccc	atc	ctg	gcg	atc	gca	144
	Ala	Leu	Trp	Phe	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	His	Pro	Ile	Leu	Ala	Ile	Ala	
			35					40					45				
25	aat	ttc	ctg	ggg	ctg	acc	tgg	ctg	tcg	gtc	gga	ttg	ttc	atc	atc	gcg	192
	Asn	Phe	Leu	Gly	Leu	Thr	Trp	Leu	Ser	Val	Gly	Leu	Phe	Ile	Ile	Ala	
		50					55					60					
30	cat	gac	gcg	atg	cac	ggg	tcg	gtg	gtg	ccg	ggg	cgt	ccg	cgc	gcc	aat	240
	His	Asp	Ala	Met	His	Gly	Ser	Val	Val	Pro	Gly	Arg	Pro	Arg	Ala	Asn	
	65					70					75				80		
35	gcg	gcg	atg	ggc	cag	ctt	gtc	ctg	tgg	ctg	tat	gcc	gga	ttt	tcg	tgg	288
	Ala	Ala	Met	Gly	Gln	Leu	Val	Leu	Trp	Leu	Tyr	Ala	Gly	Phe	Ser	Trp	
				85				90						95			
40	cgc	aag	atg	atc	gtc	aag	cac	atg	gcc	cat	cac	cgc	cat	gcc	gga	acc	336
	Arg	Lys	Met	Ile	Val	Lys	His	Met	Ala	His	His	Arg	His	Ala	Gly	Thr	
				100				105					110				
45	gac	gac	gac	ccc	gat	ttc	gac	cat	ggc	ggc	ccg	gtc	cgc	tgg	tac	gcc	384
	Asp	Asp	Asp	Pro	Asp	Phe	Asp	His	Gly	Gly	Pro	Val	Arg	Trp	Tyr	Ala	
			115				120					125					
50	cgc	ttc	atc	ggc	acc	tat	ttc	ggc	tgg	cgc	gag	ggg	ctg	ctg	ctg	ccc	432
	Arg	Phe	Ile	Gly	Thr	Tyr	Phe	Gly	Trp	Arg	Glu	Gly	Leu	Leu	Leu	Pro	
		130					135				140						
55	gtc	atc	gtg	acg	gtc	tat	gcg	ctg	atc	ctt	ggg	gat	cgc	tgg	atg	tac	480
	Val	Ile	Val	Thr	Val	Tyr	Ala	Leu	Ile	Leu	Gly	Asp	Arg	Trp	Met	Tyr	
	145					150					155				160		
60	gtg	gtc	ttc	tgg	ccg	ctg	ccg	tcg	atc	ctg	gcg	tcg	atc	cag	ctg	ttc	528

## 99

	Val	Val	Phe	Trp	Pro	Leu	Pro	Ser	Ile	Leu	Ala	Ser	Ile	Gln	Leu	Phe	
					165					170					175		
5	gtg	ttc	ggc	acc	tgg	ctg	ccg	cac	cgc	ccc	ggc	cac	gac	gcg	ttc	ccg	576
	Val	Phe	Gly	Thr	Trp	Leu	Pro	His	Arg	Pro	Gly	His	Asp	Ala	Phe	Pro	
				180					185						190		
10	gac	cgc	cac	aat	gcg	cgg	tcg	tcg	cgg	atc	agc	gac	ccc	gtg	tcg	ctg	624
	Asp	Arg	His	Asn	Ala	Arg	Ser	Ser	Arg	Ile	Ser	Asp	Pro	Val	Ser	Leu	
				195					200						205		
15	ctg	acc	tgc	ttt	cac	ttt	ggc	ggt	tat	cat	cac	gaa	cac	cac	ctg	cac	672
	Leu	Thr	Cys	Phe	His	Phe	Gly	Gly	Tyr	His	His	Glu	His	His	Leu	His	
		210					215					220					
	ccg	acg	gtg	ccg	tgg	tgg	cgc	ctg	ccc	agc	acc	cgc	acc	aag	ggg	gac	720
	Pro	Thr	Val	Pro	Trp	Trp	Arg	Leu	Pro	Ser	Thr	Arg	Thr	Lys	Gly	Asp	
	225					230					235				240		
20	acc	gca	tga														729
	Thr	Ala															
25	<210>	84															
	<211>	242															
	<212>	PRT															
30	<213>	Paracoccus sp. MBIC1143															
35	<400>	84															
	Met	Ser	Ala	His	Ala	Leu	Pro	Lys	Ala	Asp	Leu	Thr	Ala	Thr	Ser	Leu	
	1				5					10					15		
40	Ile	Val	Ser	Gly	Gly	Ile	Ile	Ala	Ala	Trp	Leu	Ala	Leu	His	Val	His	
				20					25					30			
45	Ala	Leu	Trp	Phe	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	His	Pro	Ile	Leu	Ala	Ile	Ala	
				35					40					45			
50	Asn	Phe	Leu	Gly	Leu	Thr	Trp	Leu	Ser	Val	Gly	Leu	Phe	Ile	Ile	Ala	
		50						55				60					

## 100

5 His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn  
65 70 75 80

Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp  
85 90 95

10 Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr  
100 105 110

15 Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala  
115 120 125

20 Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro  
130 135 140

25 Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr  
145 150 155 160

Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe  
165 170 175

30 Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro  
180 185 190

35 Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu  
195 200 205

40 Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His  
210 215 220

45 Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp  
225 230 235 240

Thr Ala

50

101

<210> 85  
 <211> 735  
 5 <212> DNA  
 <213> Brevundimonas aurantiaca  
 10  
 <220>  
 <221> CDS  
 15 <222> (1)..(735)  
 <223>  
 20  
 <400> 85  
 atg acc gcc gcc gtc gcc gag cca cgc acc gtc ccg cgc cag acc tgg 48  
 Met Thr Ala Ala Val Ala Glu Pro Arg Thr Val Pro Arg Gln Thr Trp  
 1 5 10 15  
 25  
 atc ggt ctg acc ctg gcg gga atg atc gtg gcg gga tgg gcg gtt ctg 96  
 Ile Gly Leu Thr Leu Ala Gly Met Ile Val Ala Gly Trp Ala Val Leu  
 20 25 30  
 30  
 cat gtc tac ggc gtc tat ttt cac cga tgg ggg ccg ttg acc ctg gtg 144  
 His Val Tyr Gly Val Tyr Phe His Arg Trp Gly Pro Leu Thr Leu Val  
 35 40 45  
 35  
 atc gcc ccg gcg atc gtg gcg gtc cag acc tgg ttg tcg gtc ggc ctt 192  
 Ile Ala Pro Ala Ile Val Ala Val Gln Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu  
 50 55 60  
 40  
 ttc atc gtc gcc cat gac gcc atg tac ggc tcc ctg gcg ccg gga cgg 240  
 Phe Ile Val Ala His Asp Ala Met Tyr Gly Ser Leu Ala Pro Gly Arg  
 65 70 75 80  
 45  
 ccg cgg ctg aac gcc gca gtc ggc cgg ctg acc ctg ggg ctc tat gcg 288  
 Pro Arg Leu Asn Ala Ala Val Gly Arg Leu Thr Leu Gly Leu Tyr Ala  
 85 90 95  
 50  
 ggc ttc cgc ttc gat cgg ctg aag acg gcg cac cac gcc cac cac gcc 336  
 Gly Phe Arg Phe Asp Arg Leu Lys Thr Ala His His Ala His His Ala  
 100 105 110  
 50  
 gcg ccc ggc acg gcc gac gac ccg gat ttt cac gcc ccg gcg ccc cgc 384



## 102

	Ala	Pro	Gly	Thr	Ala	Asp	Asp	Pro	Asp	Phe	His	Ala	Pro	Ala	Pro	Arg	
			115					120					125				
5	gcc	ttc	ctt	ccc	tgg	ttc	ctg	aac	ttc	ttt	cgc	acc	tat	ttc	ggc	tgg	432
	Ala	Phe	Leu	Pro	Trp	Phe	Leu	Asn	Phe	Phe	Arg	Thr	Tyr	Phe	Gly	Trp	
			130				135				140						
10	cgc	gag	atg	gcg	gtc	ctg	acc	gcc	ctg	gtc	ctg	atc	gcc	ctc	ttc	ggc	480
	Arg	Glu	Met	Ala	Val	Leu	Thr	Ala	Leu	Val	Leu	Ile	Ala	Leu	Phe	Gly	
	145					150					155				160		
15	ctg	ggg	gcg	cgg	ccg	gcc	aat	ctc	ctg	acc	ttc	tgg	gcc	gcg	ccg	gcc	528
	Leu	Gly	Ala	Arg	Pro	Ala	Asn	Leu	Leu	Thr	Phe	Trp	Ala	Ala	Pro	Ala	
					165					170					175		
	ctg	ctt	tca	gcg	ctt	cag	ctc	ttc	acc	ttc	ggc	acc	tgg	ctg	ccg	cac	576
	Leu	Leu	Ser	Ala	Leu	Gln	Leu	Phe	Thr	Phe	Gly	Thr	Trp	Leu	Pro	His	
				180				185						190			
20	cgc	cac	acc	gac	cag	ccg	ttc	gcc	gac	gcg	cac	cac	gcc	cgc	agc	agc	624
	Arg	His	Thr	Asp	Gln	Pro	Phe	Ala	Asp	Ala	His	His	Ala	Arg	Ser	Ser	
				195			200						205				
25	ggc	tac	ggc	ccc	gtg	ctt	tcc	ctg	ctc	acc	tgt	ttc	cac	ttc	ggc	cgc	672
	Gly	Tyr	Gly	Pro	Val	Leu	Ser	Leu	Leu	Thr	Cys	Phe	His	Phe	Gly	Arg	
		210				215					220						
30	cac	cac	gaa	cac	cat	ctg	agc	ccc	tgg	cgg	ccc	tgg	tgg	cgt	ctg	tgg	720
	His	His	Glu	His	His	Leu	Ser	Pro	Trp	Arg	Pro	Trp	Trp	Arg	Leu	Trp	
	225					230				235					240		
	cgc	ggc	gag	tct	tga												735
	Arg	Gly	Glu	Ser													
35																	
	<210>		86														
	<211>		244														
40	<212>		PRT														
	<213>		Brevundimonas aurantiaca														
45																	
	<400>		86														
50	Met	Thr	Ala	Ala	Val	Ala	Glu	Pro	Arg	Thr	Val	Pro	Arg	Gln	Thr	Trp	
	1				5					10					15		

Ile Gly Leu Thr Leu Ala Gly Met Ile Val Ala Gly Trp Ala Val Leu  
 20 25 30  
 5

His Val Tyr Gly Val Tyr Phe His Arg Trp Gly Pro Leu Thr Leu Val  
 35 40 45  
 10

Ile Ala Pro Ala Ile Val Ala Val Gln Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu  
 50 55 60

Phe Ile Val Ala His Asp Ala Met Tyr Gly Ser Leu Ala Pro Gly Arg  
 65 70 75 80  
 15

Pro Arg Leu Asn Ala Ala Val Gly Arg Leu Thr Leu Gly Leu Tyr Ala  
 85 90 95  
 20

Gly Phe Arg Phe Asp Arg Leu Lys Thr Ala His His Ala His His Ala  
 100 105 110  
 25

Ala Pro Gly Thr Ala Asp Asp Pro Asp Phe His Ala Pro Ala Pro Arg  
 115 120 125  
 30

Ala Phe Leu Pro Trp Phe Leu Asn Phe Phe Arg Thr Tyr Phe Gly Trp  
 130 135 140  
 35

Arg Glu Met Ala Val Leu Thr Ala Leu Val Leu Ile Ala Leu Phe Gly  
 145 150 155 160

Leu Gly Ala Arg Pro Ala Asn Leu Leu Thr Phe Trp Ala Ala Pro Ala  
 165 170 175  
 40

Leu Leu Ser Ala Leu Gln Leu Phe Thr Phe Gly Thr Trp Leu Pro His  
 180 185 190  
 45

Arg His Thr Asp Gln Pro Phe Ala Asp Ala His His Ala Arg Ser Ser  
 195 200 205  
 50

## 104

Gly Tyr Gly Pro Val Leu Ser Leu Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Arg  
 210 215 220

5 His His Glu His His Leu Ser Pro Trp Arg Pro Trp Trp Arg Leu Trp  
 225 230 235 240

Arg Gly Glu Ser  
 10

<210> 87

15 <211> 690

<212> DNA

<213> Nodularia spumigena NSOR10  
 20

<220>

25 <221> CDS

<222> (1)..(690)

<223>

30

<400> 87

35 atg gcg atc gcc att att agt ata tgg gct atc agc cta ggt ttg tta 48  
 Met Ala Ile Ala Ile Ile Ser Ile Trp Ala Ile Ser Leu Gly Leu Leu  
 1 5 10 15

ctt tat att gat ata tcc caa ttc aag ttt tgg atg ttg tta ccg ctc 96  
 Leu Tyr Ile Asp Ile Ser Gln Phe Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Leu  
 40 20 25 30

ata ttt tgg caa aca ttt tta tat acg gga tta ttt att aca gct cat 144  
 Ile Phe Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His  
 35 40 45

45 gat gcc atg cat ggg gta gtt ttt ccc aaa aat ccc aaa atc aac cat 192  
 Asp Ala Met His Gly Val Val Phe Pro Lys Asn Pro Lys Ile Asn His  
 50 55 60

50 ttc att ggc tca ttg tgc ctg ttt ctt tat ggt ctt tta cct tat caa 240

## 105

	Phe Ile Gly Ser Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln	
	65 70 75 80	
5	aaa ctt tta aaa aag cat tgg cta cat cac cat aat cca gcc agt gaa Lys Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser Glu	288
	85 90 95	
10	aca gat cca gat ttt cac aac ggg aag cag aaa aac ttt ttt gct tgg Thr Asp Pro Asp Phe His Asn Gly Lys Gln Lys Asn Phe Phe Ala Trp	336
	100 105 110	
15	tat tta tat ttt atg aag cgt tac tgg agt tgg tta caa att atc aca Tyr Leu Tyr Phe Met Lys Arg Tyr Trp Ser Trp Leu Gln Ile Ile Thr	384
	115 120 125	
	tta atg att att tat aac tta cta aaa tat ata tgg cat ttt cca gag Leu Met Ile Ile Tyr Asn Leu Leu Lys Tyr Ile Trp His Phe Pro Glu	432
	130 135 140	
20	gat aat atg act tat ttt tgg gta gtt ccc tca att tta agt tct tta Asp Asn Met Thr Tyr Phe Trp Val Val Pro Ser Ile Leu Ser Ser Leu	480
	145 150 155 160	
25	caa tta ttt tat ttt gga act ttt cta ccc cac agt gag cct gta gaa Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Val Glu	528
	165 170 175	
30	ggg tat aaa gag cct cat cgt tcc caa act att agc cgt ccc att tgg Gly Tyr Lys Glu Pro His Arg Ser Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp	576
	180 185 190	
35	tgg tca ttt ata act tgt tac cat ttt ggt tat cat tac gaa cat cat Trp Ser Phe Ile Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Tyr Glu His His	624
	195 200 205	
	gaa tac ccc cat gtt cct tgg tgg caa tta cca gaa att tat aaa atg Glu Tyr Pro His Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Met	672
	210 215 220	
40	tct aaa tca aat ttg tga Ser Lys Ser Asn Leu	690
	225	
45	<210> 88	
	<211> 229	
	<212> PRT	
50	.	

106

&lt;213&gt; Nodularia spumigena NSOR10

5 &lt;400&gt; 88

Met Ala Ile Ala Ile Ile Ser Ile Trp Ala Ile Ser Leu Gly Leu Leu  
 1 5 10 15

10

Leu Tyr Ile Asp Ile Ser Gln Phe Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Leu  
 20 25 30

15

Ile Phe Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His  
 35 40 45

20

Asp Ala Met His Gly Val Val Phe Pro Lys Asn Pro Lys Ile Asn His  
 50 55 60

25

Phe Ile Gly Ser Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln  
 65 70 75 80

Lys Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser Glu  
 85 90 95

30

Thr Asp Pro Asp Phe His Asn Gly Lys Gln Lys Asn Phe Phe Ala Trp  
 100 105 110

35

Tyr Leu Tyr Phe Met Lys Arg Tyr Trp Ser Trp Leu Gln Ile Ile Thr  
 115 120 125

40

Leu Met Ile Ile Tyr Asn Leu Leu Lys Tyr Ile Trp His Phe Pro Glu  
 130 135 140

45

Asp Asn Met Thr Tyr Phe Trp Val Val Pro Ser Ile Leu Ser Ser Leu  
 145 150 155 160

Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Val Glu  
 165 170 175

50

## 107

	Gly	Tyr	Lys	Glu	Pro	His	Arg	Ser	Gln	Thr	Ile	Ser	Arg	Pro	Ile	Trp	
				180					185					190			
5	Trp	Ser	Phe	Ile	Thr	Cys	Tyr	His	Phe	Gly	Tyr	His	Tyr	Glu	His	His	
			195					200					205				
10	Glu	Tyr	Pro	His	Val	Pro	Trp	Trp	Gln	Leu	Pro	Glu	Ile	Tyr	Lys	Met	
	210						215					220					
15	Ser	Lys	Ser	Asn	Leu												
	225																
	<210>	89															
	<211>	789															
20	<212>	DNA															
	<213>	Nostoc punctiforme ATCC 29133															
25	<220>																
	<221>	CDS															
30	<222>	(1)..(789)															
	<223>																
35	<400>	89															
	ttg	aat	ttt	tgt	gat	aaa	cca	ggt	agc	tat	tat	ggt	gca	ata	gag	caa	48
	Leu	Asn	Phe	Cys	Asp	Lys	Pro	Val	Ser	Tyr	Tyr	Val	Ala	Ile	Glu	Gln	
40	1			5					10				15				
	tta	agt	gct	aaa	gaa	gat	act	ggt	tgg	ggg	ctg	gtg	att	gtc	ata	gta	96
	Leu	Ser	Ala	Lys	Glu	Asp	Thr	Val	Trp	Gly	Leu	Val	Ile	Val	Ile	Val	
			20					25				30					
45	att	att	agt	ctt	tgg	gta	gct	agt	ttg	gct	ttt	tta	cta	gct	att	aat	144
	Ile	Ile	Ser	Leu	Trp	Val	Ala	Ser	Leu	Ala	Phe	Leu	Leu	Ala	Ile	Asn	
			35					40				45					
50	tat	gcc	aaa	gtc	cca	att	tgg	ttg	ata	cct	att	gca	ata	ggt	tgg	caa	192

## 108

	Tyr	Ala	Lys	Val	Pro	Ile	Trp	Leu	Ile	Pro	Ile	Ala	Ile	Val	Trp	Gln	
	50						55					60					
5	atg	ttc	ctt	tat	aca	ggg	cta	ttt	att	act	gca	cat	gat	gct	atg	cat	240
	Met	Phe	Leu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Phe	Ile	Thr	Ala	His	Asp	Ala	Met	His	
	65					70				75					80		
10	ggg	tca	gtt	tat	cgt	aaa	aat	ccc	aaa	att	aat	aat	ttt	atc	ggg	tca	288
	Gly	Ser	Val	Tyr	Arg	Lys	Asn	Pro	Lys	Ile	Asn	Asn	Phe	Ile	Gly	Ser	
					85					90					95		
15	cta	gct	gta	gcg	ctt	tac	gct	gtg	ttt	cca	tat	caa	cag	atg	tta	aag	336
	Leu	Ala	Val	Ala	Leu	Tyr	Ala	Val	Phe	Pro	Tyr	Gln	Gln	Met	Leu	Lys	
				100					105					110			
	aat	cat	tgc	tta	cat	cat	cgt	cat	cct	gct	agc	gaa	gtt	gac	cca	gat	384
	Asn	His	Cys	Leu	His	His	Arg	His	Pro	Ala	Ser	Glu	Val	Asp	Pro	Asp	
			115						120					125			
20	ttt	cat	gat	ggg	aag	aga	aca	aac	gct	att	ttc	tgg	tat	ctc	cat	ttc	432
	Phe	His	Asp	Gly	Lys	Arg	Thr	Asn	Ala	Ile	Phe	Trp	Tyr	Leu	His	Phe	
			130						135				140				
25	atg	ata	gaa	tac	tcc	agt	tgg	caa	cag	tta	ata	gta	cta	act	atc	cta	480
	Met	Ile	Glu	Tyr	Ser	Ser	Trp	Gln	Gln	Leu	Ile	Val	Leu	Thr	Ile	Leu	
	145					150						155				160	
30	ttt	aat	tta	gct	aaa	tac	gtt	ttg	cac	atc	cat	caa	ata	aat	ctc	atc	528
	Phe	Asn	Leu	Ala	Lys	Tyr	Val	Leu	His	Ile	His	Gln	Ile	Asn	Leu	Ile	
					165					170					175		
35	tta	ttt	tgg	agt	att	cct	cca	att	tta	agt	tcc	att	caa	ctg	ttt	tat	576
	Leu	Phe	Trp	Ser	Ile	Pro	Pro	Ile	Leu	Ser	Ser	Ile	Gln	Leu	Phe	Tyr	
				180					185					190			
	ttc	gga	aca	ttt	ttg	cct	cat	cga	gaa	ccc	aag	aaa	gga	tat	gtt	tat	624
	Phe	Gly	Thr	Phe	Leu	Pro	His	Arg	Glu	Pro	Lys	Lys	Gly	Tyr	Val	Tyr	
			195						200					205			
40	ccc	cat	tgc	agc	caa	aca	ata	aaa	ttg	cca	act	ttt	ttg	tca	ttt	atc	672
	Pro	His	Cys	Ser	Gln	Thr	Ile	Lys	Leu	Pro	Thr	Phe	Leu	Ser	Phe	Ile	
			210						215					220			
45	gct	tgc	tac	cac	ttt	ggg	tat	cat	gaa	gaa	cat	cat	gag	tat	ccc	cat	720
	Ala	Cys	Tyr	His	Phe	Gly	Tyr	His	Glu	Glu	His	His	Glu	Tyr	Pro	His	
	225					230					235					240	
50	gta	cct	tgg	tgg	caa	ctt	cca	tct	gta	tat	aag	cag	aga	gta	ttc	aac	768
	Val	Pro	Trp	Trp	Gln	Leu	Pro	Ser	Val	Tyr	Lys	Gln	Arg	Val	Phe	Asn	
					245						250					255	

aat tca gta acc aat tcg taa 789  
 Asn Ser Val Thr Asn Ser  
 260

5

<210> 90

<211> 262

10

<212> PRT

<213> Nostoc punctiforme ATCC 29133

15

<400> 90

Leu Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln  
 20 1 5 10 15

Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val  
 25 20 25 30

Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn  
 35 40 45

30

Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln  
 50 55 60

35

Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His  
 65 70 75 80

Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser  
 40 85 90 95

Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys  
 100 105 110

45

Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp  
 115 120 125

50



## 110

Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe  
130 135 140

5 Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu  
145 150 155 160

10 Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile  
165 170 175

15 Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr  
180 185 190

Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr  
195 200 205

20 Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile  
210 215 220

25 Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His  
225 230 235 240

30 Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn  
245 250 255

35 Asn Ser Val Thr Asn Ser  
260

<210> 91

<211> 762

40 <212> DNA

<213> Nostoc punctiforme ATCC 29133

45 <220>

<221> CDS

50

<222> (1) . . (762)

## 112

tac ttt tgg gtg cta ccc tgc ctt tta agt tca tta caa tta ttc tat 576  
 Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr  
 180 185 190  
 5  
 ttt ggt act ttt tta ccc cat agt gaa cca ata ggg ggt tat gtt cag 624  
 Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln  
 195 200 205  
 10  
 cct cat tgt gcc caa aca att agc cgt cct att tgg tgg tca ttt atc 672  
 Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile  
 210 215 220  
 15  
 acg tgc tat cat ttt ggc tac cac gag gaa cat cac gaa tat cct cat 720  
 Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His  
 225 230 235 240  
 20  
 att tct tgg tgg cag tta cca gaa att tac aaa gca aaa tag 762  
 Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys  
 245 250  
 <210> 92  
 25 <211> 253  
 <212> PRT  
 <213> Nostoc punctiforme ATCC 29133  
 30  
 <400> 92  
 35 Val Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro  
 1 5 10 15  
 40 Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val  
 20 25 30  
 45 Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Leu Ser Leu Asp  
 35 40 45  
 50  
 Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln  
 50 55 60  
 50

	Thr	Phe	Leu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Phe	Ile	Thr	Ser	His	Asp	Ala	Met	His	
	65						70				75					80	
5	Gly	Val	Val	Phe	Pro	Gln	Asn	Thr	Lys	Ile	Asn	His	Leu	Ile	Gly	Thr	
					85					90					95		
10	Leu	Thr	Leu	Ser	Leu	Tyr	Gly	Leu	Leu	Pro	Tyr	Gln	Lys	Leu	Leu	Lys	
				100					105					110			
15	Lys	His	Trp	Leu	His	His	His	Asn	Pro	Ala	Ser	Ser	Ile	Asp	Pro	Asp	
			115					120					125				
20	Phe	His	Asn	Gly	Lys	His	Gln	Ser	Phe	Phe	Ala	Trp	Tyr	Phe	His	Phe	
		130					135					140					
25	Met	Lys	Gly	Tyr	Trp	Ser	Trp	Gly	Gln	Ile	Ile	Ala	Leu	Thr	Ile	Ile	
	145					150					155					160	
30	Tyr	Asn	Phe	Ala	Lys	Tyr	Ile	Leu	His	Ile	Pro	Ser	Asp	Asn	Leu	Thr	
					165					170					175		
35	Tyr	Phe	Trp	Val	Leu	Pro	Ser	Leu	Leu	Ser	Ser	Leu	Gln	Leu	Phe	Tyr	
				180					185					190			
40	Phe	Gly	Thr	Phe	Leu	Pro	His	Ser	Glu	Pro	Ile	Gly	Gly	Tyr	Val	Gln	
			195					200					205				
45	Pro	His	Cys	Ala	Gln	Thr	Ile	Ser	Arg	Pro	Ile	Trp	Trp	Ser	Phe	Ile	
		210					215					220					
50	Thr	Cys	Tyr	His	Phe	Gly	Tyr	His	Glu	Glu	His	His	Glu	Tyr	Pro	His	
	225					230					235					240	
55	Ile	Ser	Trp	Trp	Gln	Leu	Pro	Glu	Ile	Tyr	Lys	Ala	Lys				
					245					250							
60	<210> 93																

<211> 1536

<212> DNA

5 <213> *Deinococcus radiodurans* R1

<220>

10 <221> CDS

<222> (1) .. (1536)

15 <223>

<400> 93

20 atg ccg gat tac gac ctg atc gtc atg ggc gcg ggc cac aac gcg ctg 48  
Met Pro Asp Tyr Asp Leu Ile Val Met Gly Ala Gly His Asn Ala Leu  
1 5 10 15

25 gtg act gct gcc tac gcc gcc cgg gcg ggc ctg aaa gtc ggc gtg ttc 96  
Val Thr Ala Ala Tyr Ala Ala Arg Ala Gly Leu Lys Val Gly Val Phe  
20 25 30

30 gag cgg cgg cac ctc gtc ggc ggg gcg gtc agc acc gag gag gtc gtg 144  
Glu Arg Arg His Leu Val Gly Gly Ala Val Ser Thr Glu Glu Val Val  
35 40 45

35 ccc ggt tac cgc ttc gac tac ggc ggc agc gcc cac atc ctg att cgg 192  
Pro Gly Tyr Arg Phe Asp Tyr Gly Gly Ser Ala His Ile Leu Ile Arg  
50 55 60

atg acg ccc atc gtg cgc gaa ctc gaa ctc acg cgg cac ggg ctg cat 240  
Met Thr Pro Ile Val Arg Glu Leu Glu Leu Thr Arg His Gly Leu His  
65 70 75 80

40 tac ctc gaa gtg gac cct atg ttt cac gct tcc gac ggt gaa acg ccc 288  
Tyr Leu Glu Val Asp Pro Met Phe His Ala Ser Asp Gly Glu Thr Pro  
85 90 95

45 tgg ttc att cac cgc gac gcc ggg cgg acc atc cgc gaa ctg gac gaa 336  
Trp Phe Ile His Arg Asp Ala Gly Arg Thr Ile Arg Glu Leu Asp Glu  
100 105 110

50 aag ttt ccc ggg cag ggc gac gcc tac ggg cgc ttt ctc gac gat tgg 384  
Lys Phe Pro Gly Gln Gly Asp Ala Tyr Gly Arg Phe Leu Asp Asp Trp  
115 120 125

## 115

5	aca ccc ttc gcg cgc gcc gtg gcc gac ctg ttc aac tcg gcg ccg ggg	432
	Thr Pro Phe Ala Arg Ala Val Ala Asp Leu Phe Asn Ser Ala Pro Gly	
	130 135 140	
	ccg ctc gac ctg ggc aaa atg gtg atg cgc agc ggc cag ggc aag gac	480
	Pro Leu Asp Leu Gly Lys Met Val Met Arg Ser Gly Gln Gly Lys Asp	
10	145 150 155 160	
	tgg aac gag cag ctc ccg cgc atc ctg cgg ccc tac ggc gac gtg gcg	528
	Trp Asn Glu Gln Leu Pro Arg Ile Leu Arg Pro Tyr Gly Asp Val Ala	
15	165 170 175	
	cgc gag tac ttc agc gag gag cgc gtg cgg gct ccc ctg acc tgg atg	576
	Arg Glu Tyr Phe Ser Glu Glu Arg Val Arg Ala Pro Leu Thr Trp Met	
20	180 185 190	
	gcg gcc cag agc ggc ccc cca ccc tcg gac ccg ctg agc gcg ccc ttt	624
	Ala Ala Gln Ser Gly Pro Pro Pro Ser Asp Pro Leu Ser Ala Pro Phe	
25	195 200 205	
	ttg ctg tgg cac ccg ctc tac cac gaa ggc ggc gtg gcg ccg ccc aaa	672
	Leu Leu Trp His Pro Leu Tyr His Glu Gly Gly Val Ala Arg Pro Lys	
30	210 215 220	
	ggc ggc agc ggc ggc ctg acc aaa gcc ctg cgc ccg gcc acc gag gcc	720
	Gly Gly Ser Gly Gly Leu Thr Lys Ala Leu Arg Arg Ala Thr Glu Ala	
35	225 230 235 240	
	gaa ggc ggc gag gtc ttc acc gac gcg ccg gtc aag gaa att ctg gtc	768
	Glu Gly Gly Glu Val Phe Thr Asp Ala Pro Val Lys Glu Ile Leu Val	
40	245 250 255	
	aag gac ggc aag gcg cag ggc atc cgg ctg gaa agc ggc gag acg tac	816
	Lys Asp Gly Lys Ala Gln Gly Ile Arg Leu Glu Ser Gly Glu Thr Tyr	
45	260 265 270	
	acc gcc cgc gcc gtc gtg tcg ggc gtc cac atc ctg acc act gcg aat	864
	Thr Ala Arg Ala Val Val Ser Gly Val His Ile Leu Thr Thr Ala Asn	
50	275 280 285	
	gcc ctg ccc gcc gaa tat gtc cct agc gcc gcc agg aat gtg cgc gtg	912
	Ala Leu Pro Ala Glu Tyr Val Pro Ser Ala Ala Arg Asn Val Arg Val	
55	290 295 300	
	ggc aac ggc ttc ggc atg att ttg cgc ctc gcc ctc agt gaa aaa gtc	960
	Gly Asn Gly Phe Gly Met Ile Leu Arg Leu Ala Leu Ser Glu Lys Val	
60	305 310 315 320	
	aaa tac cgt cac cac acc gag ccc gac tca cgc atc ggc ctg gga ttg	1008

## 116

	Lys	Tyr	Arg	His	His	Thr	Glu	Pro	Asp	Ser	Arg	Ile	Gly	Leu	Gly	Leu	
					325					330					335		
5	ctg	atc	aaa	aac	gag	cgg	caa	atc	atg	cag	ggc	tac	ggc	gaa	tac	ctc	1056
	Leu	Ile	Lys	Asn	Glu	Arg	Gln	Ile	Met	Gln	Gly	Tyr	Gly	Glu	Tyr	Leu	
				340					345					350			
10	gcc	ggg	cag	ccc	acc	acc	gac	ccg	ccc	ctc	gtc	gcc	atg	agc	ttc	agc	1104
	Ala	Gly	Gln	Pro	Thr	Thr	Asp	Pro	Pro	Leu	Val	Ala	Met	Ser	Phe	Ser	
			355					360					365				
15	gcg	gtg	gac	gac	tcg	ctc	gcc	cca	ccg	aac	ggc	gac	gtg	ttg	tgg	ctg	1152
	Ala	Val	Asp	Asp	Ser	Leu	Ala	Pro	Pro	Asn	Gly	Asp	Val	Leu	Trp	Leu	
		370					375					380					
	tgg	gcg	cag	tac	tac	ccc	ttc	gag	ctc	gcc	acc	ggg	agc	tgg	gaa	acg	1200
	Trp	Ala	Gln	Tyr	Tyr	Pro	Phe	Glu	Leu	Ala	Thr	Gly	Ser	Trp	Glu	Thr	
	385					390				395						400	
20	cgc	acc	gcc	gaa	gcg	cgg	gag	aac	atc	ctg	cgg	gcc	ttt	gag	cac	tac	1248
	Arg	Thr	Ala	Glu	Ala	Arg	Glu	Asn	Ile	Leu	Arg	Ala	Phe	Glu	His	Tyr	
				405						410					415		
25	gcg	ccg	ggc	acc	cgc	gac	acg	att	gtg	ggc	gaa	ctc	gtg	cag	acg	ccg	1296
	Ala	Pro	Gly	Thr	Arg	Asp	Thr	Ile	Val	Gly	Glu	Leu	Val	Gln	Thr	Pro	
			420					425					430				
30	cag	tgg	ctg	gaa	acc	aac	ctc	ggc	ctg	cac	cgg	ggc	aac	gtg	atg	cac	1344
	Gln	Trp	Leu	Glu	Thr	Asn	Leu	Gly	Leu	His	Arg	Gly	Asn	Val	Met	His	
		435					440					445					
35	ctg	gaa	atg	tcc	ttc	gac	cag	atg	ttc	tcc	ttc	cgc	ccc	tgg	ctg	aaa	1392
	Leu	Glu	Met	Ser	Phe	Asp	Gln	Met	Phe	Ser	Phe	Arg	Pro	Trp	Leu	Lys	
		450					455				460						
	gcg	agc	cag	tac	cgc	tgg	ccg	ggc	gtg	cag	ggg	ctg	tac	ctc	acc	ggc	1440
	Ala	Ser	Gln	Tyr	Arg	Trp	Pro	Gly	Val	Gln	Gly	Leu	Tyr	Leu	Thr	Gly	
	465					470				475					480		
40	gcc	agc	acc	cac	ccc	ggc	gga	ggc	atc	atg	ggc	gcc	tcg	gga	cgc	aac	1488
	Ala	Ser	Thr	His	Pro	Gly	Gly	Gly	Ile	Met	Gly	Ala	Ser	Gly	Arg	Asn	
				485					490						495		
45	gcg	gcg	cgg	gtc	atc	gtg	aag	gac	ctg	acg	cgg	agg	cgc	tgg	aaa	tga	1536
	Ala	Ala	Arg	Val	Ile	Val	Lys	Asp	Leu	Thr	Arg	Arg	Arg	Trp	Lys		
			500					505						510			

&lt;210&gt; 94

117

<211> 511

<212> PRT

5 <213> Deinococcus radiodurans R1

<400> 94

10 Met Pro Asp Tyr Asp Leu Ile Val Met Gly Ala Gly His Asn Ala Leu  
1 5 10 15

15 Val Thr Ala Ala Tyr Ala Ala Arg Ala Gly Leu Lys Val Gly Val Phe  
20 25 30

20 Glu Arg Arg His Leu Val Gly Gly Ala Val Ser Thr Glu Glu Val Val  
35 40 45

25 Pro Gly Tyr Arg Phe Asp Tyr Gly Gly Ser Ala His Ile Leu Ile Arg  
50 55 60

Met Thr Pro Ile Val Arg Glu Leu Glu Leu Thr Arg His Gly Leu His  
65 70 75 80

30 Tyr Leu Glu Val Asp Pro Met Phe His Ala Ser Asp Gly Glu Thr Pro  
85 90 95

35 Trp Phe Ile His Arg Asp Ala Gly Arg Thr Ile Arg Glu Leu Asp Glu  
100 105 110

40 Lys Phe Pro Gly Gln Gly Asp Ala Tyr Gly Arg Phe Leu Asp Asp Trp  
115 120 125

45 Thr Pro Phe Ala Arg Ala Val Ala Asp Leu Phe Asn Ser Ala Pro Gly  
130 135 140

Pro Leu Asp Leu Gly Lys Met Val Met Arg Ser Gly Gln Gly Lys Asp  
145 150 155 160

50



## 118

	Trp	Asn	Glu	Gln	Leu	Pro	Arg	Ile	Leu	Arg	Pro	Tyr	Gly	Asp	Val	Ala	
					165					170					175		
5	Arg	Glu	Tyr	Phe	Ser	Glu	Glu	Arg	Val	Arg	Ala	Pro	Leu	Thr	Trp	Met	
				180					185					190			
10	Ala	Ala	Gln	Ser	Gly	Pro	Pro	Pro	Ser	Asp	Pro	Leu	Ser	Ala	Pro	Phe	
			195					200					205				
15	Leu	Leu	Trp	His	Pro	Leu	Tyr	His	Glu	Gly	Gly	Val	Ala	Arg	Pro	Lys	
		210					215					220					
20	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Leu	Thr	Lys	Ala	Leu	Arg	Arg	Ala	Thr	Glu	Ala	
	225					230					235					240	
25	Lys	Asp	Gly	Lys	Ala	Gln	Gly	Ile	Arg	Leu	Glu	Ser	Gly	Glu	Thr	Tyr	
				260					265					270			
30	Thr	Ala	Arg	Ala	Val	Val	Ser	Gly	Val	His	Ile	Leu	Thr	Thr	Ala	Asn	
		275						280					285				
35	Ala	Leu	Pro	Ala	Glu	Tyr	Val	Pro	Ser	Ala	Ala	Arg	Asn	Val	Arg	Val	
		290					295					300					
40	Gly	Asn	Gly	Phe	Gly	Met	Ile	Leu	Arg	Leu	Ala	Leu	Ser	Glu	Lys	Val	
	305					310					315					320	
45	Lys	Tyr	Arg	His	His	Thr	Glu	Pro	Asp	Ser	Arg	Ile	Gly	Leu	Gly	Leu	
				325						330				335			
50	Leu	Ile	Lys	Asn	Glu	Arg	Gln	Ile	Met	Gln	Gly	Tyr	Gly	Glu	Tyr	Leu	
			340						345					350			
55	Ala	Gly	Gln	Pro	Thr	Thr	Asp	Pro	Pro	Leu	Val	Ala	Met	Ser	Phe	Ser	
		355						360					365				

Ala Val Asp Asp Ser Leu Ala Pro Pro Asn Gly Asp Val Leu Trp Leu  
370 375 380

5

Trp Ala Gln Tyr Tyr Pro Phe Glu Leu Ala Thr Gly Ser Trp Glu Thr  
385 390 395 400

10

Arg Thr Ala Glu Ala Arg Glu Asn Ile Leu Arg Ala Phe Glu His Tyr  
405 410 415

15

Ala Pro Gly Thr Arg Asp Thr Ile Val Gly Glu Leu Val Gln Thr Pro  
420 425 430

20

Gln Trp Leu Glu Thr Asn Leu Gly Leu His Arg Gly Asn Val Met His  
435 440 445

25

Leu Glu Met Ser Phe Asp Gln Met Phe Ser Phe Arg Pro Trp Leu Lys  
450 455 460

30

Ala Ser Gln Tyr Arg Trp Pro Gly Val Gln Gly Leu Tyr Leu Thr Gly  
465 470 475 480

35

Ala Ala Arg Val Ile Val Lys Asp Leu Thr Arg Arg Arg Trp Lys  
500 505 510

40

<210> 95

<211> 1666

<212> DNA

45

<213> Lycopersicon esculentum

50

<220>

120

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1494)

5 &lt;223&gt;

<400> 95  
 10 atg gaa gct ctt ctc aag cct ttt cca tct ctt tta ctt tcc tct cct 48  
 Met Glu Ala Leu Leu Lys Pro Phe Pro Ser Leu Leu Leu Ser Ser Pro  
 1 5 10 15  
 15 aca ccc cat agg tct att ttc caa caa aat ccc tct ttt cta agt ccc 96  
 Thr Pro His Arg Ser Ile Phe Gln Gln Asn Pro Ser Phe Leu Ser Pro  
 20 25 30  
 20 acc acc aaa aaa aaa tca aga aaa tgt ctt ctt aga aac aaa agt agt 144  
 Thr Thr Lys Lys Lys Ser Arg Lys Cys Leu Leu Arg Asn Lys Ser Ser  
 35 40 45  
 25 aaa ctt ttt tgt agc ttt ctt gat tta gca ccc aca tca aag cca gag 192  
 Lys Leu Phe Cys Ser Phe Leu Asp Leu Ala Pro Thr Ser Lys Pro Glu  
 50 55 60  
 25 tct tta gat gtt aac atc tca tgg gtt gat cct aat tcg aat cgg gct 240  
 Ser Leu Asp Val Asn Ile Ser Trp Val Asp Pro Asn Ser Asn Arg Ala  
 65 70 75 80  
 30 caa ttc gac gtg atc att atc gga gct ggc cct gct ggg ctc agg cta 288  
 Gln Phe Asp Val Ile Ile Ile Gly Ala Gly Pro Ala Gly Leu Arg Leu  
 85 90 95  
 35 gct gaa caa gtt tct aaa tat ggt att aag gta tgt tgt gtt gac cct 336  
 Ala Glu Gln Val Ser Lys Tyr Gly Ile Lys Val Cys Cys Val Asp Pro  
 100 105 110  
 40 tca cca ctc tcc atg tgg cca aat aat tat ggt gtt tgg gtt gat gag 384  
 Ser Pro Leu Ser Met Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val Asp Glu  
 115 120 125  
 45 ttt gag aat tta gga ctg gaa aat tgt tta gat cat aaa tgg cct atg 432  
 Phe Glu Asn Leu Gly Leu Glu Asn Cys Leu Asp His Lys Trp Pro Met  
 130 135 140  
 45 act tgt gtg cat ata aat gat aac aaa act aag tat ttg gga aga cca 480  
 Thr Cys Val His Ile Asn Asp Asn Lys Thr Lys Tyr Leu Gly Arg Pro  
 145 150 155 160  
 50 tat ggt aga gtt agt aga aag aag ctg aag ttg aaa ttg ttg aat agt 528

## 121

	Tyr	Gly	Arg	Val	Ser	Arg	Lys	Lys	Leu	Lys	Leu	Lys	Leu	Leu	Asn	Ser	
					165				170						175		
5	tgt	gtt	gag	aac	aga	gtg	aag	ttt	tat	aaa	gct	aag	gtt	tgg	aaa	gtg	576
	Cys	Val	Glu	Asn	Arg	Val	Lys	Phe	Tyr	Lys	Ala	Lys	Val	Trp	Lys	Val	
				180					185					190			
10	gaa	cat	gaa	gaa	ttt	gag	tct	tca	att	gtt	tgt	gat	gat	ggg	aag	aag	624
	Glu	His	Glu	Glu	Phe	Glu	Ser	Ser	Ile	Val	Cys	Asp	Asp	Gly	Lys	Lys	
			195					200					205				
15	ata	aga	ggg	agt	ttg	gtt	gtg	gat	gca	agt	ggg	ttt	gct	agt	gat	ttt	672
	Ile	Arg	Gly	Ser	Leu	Val	Val	Asp	Ala	Ser	Gly	Phe	Ala	Ser	Asp	Phe	
			210				215					220					
	ata	gag	tat	gac	agg	cca	aga	aac	cat	ggg	tat	caa	att	gct	cat	ggg	720
	Ile	Glu	Tyr	Asp	Arg	Pro	Arg	Asn	His	Gly	Tyr	Gln	Ile	Ala	His	Gly	
	225					230				235				240			
20	gtt	tta	gta	gaa	gtt	gat	aat	cat	cca	ttt	gat	ttg	gat	aaa	atg	gtg	768
	Val	Leu	Val	Glu	Val	Asp	Asn	His	Pro	Phe	Asp	Leu	Asp	Lys	Met	Val	
					245					250					255		
25	ctt	atg	gat	tgg	agg	gat	tct	cat	ttg	ggg	aat	gag	cca	tat	tta	agg	816
	Leu	Met	Asp	Trp	Arg	Asp	Ser	His	Leu	Gly	Asn	Glu	Pro	Tyr	Leu	Arg	
				260					265					270			
30	gtg	aat	aat	gct	aaa	gaa	cca	aca	ttc	ttg	tat	gca	atg	cca	ttt	gat	864
	Val	Asn	Asn	Ala	Lys	Glu	Pro	Thr	Phe	Leu	Tyr	Ala	Met	Pro	Phe	Asp	
			275					280					285				
35	aga	gat	ttg	gtt	ttc	ttg	gaa	gag	act	tct	ttg	gtg	agt	cgt	cct	gtt	912
	Arg	Asp	Leu	Val	Phe	Leu	Glu	Glu	Thr	Ser	Leu	Val	Ser	Arg	Pro	Val	
			290				295					300					
	tta	tcg	tat	atg	gaa	gta	aaa	aga	agg	atg	gtg	gca	aga	tta	agg	cat	960
	Leu	Ser	Tyr	Met	Glu	Val	Lys	Arg	Arg	Met	Val	Ala	Arg	Leu	Arg	His	
	305					310					315				320		
40	ttg	ggg	atc	aaa	gtg	aaa	agt	gtt	att	gag	gaa	gag	aaa	tgt	gtg	atc	1008
	Leu	Gly	Ile	Lys	Val	Lys	Ser	Val	Ile	Glu	Glu	Glu	Lys	Cys	Val	Ile	
					325					330					335		
45	cct	atg	gga	gga	cca	ctt	ccg	cgg	att	cct	caa	aat	gtt	atg	gct	att	1056
	Pro	Met	Gly	Gly	Pro	Leu	Pro	Arg	Ile	Pro	Gln	Asn	Val	Met	Ala	Ile	
				340					345					350			
50	ggg	ggg	aat	tca	ggg	ata	gtt	cat	cca	tca	aca	ggg	tac	atg	gtg	gct	1104
	Gly	Gly	Asn	Ser	Gly	Ile	Val	His	Pro	Ser	Thr	Gly	Tyr	Met	Val	Ala	
			355					360					365				

## 122

	agg agc atg gct tta gca cca gta cta gct gaa gcc atc gtc gag ggg	1152
	Arg Ser Met Ala Leu Ala Pro Val Leu Ala Glu Ala Ile Val Glu Gly	
	370 375 380	
5	ctt ggc tca aca aga atg ata aga ggg tct caa ctt tac cat aga gtt	1200
	Leu Gly Ser Thr Arg Met Ile Arg Gly Ser Gln Leu Tyr His Arg Val	
	385 390 395 400	
10	tgg aat ggt ttg tgg cct ttg gat aga aga tgt gtt aga gaa tgt tat	1248
	Trp Asn Gly Leu Trp Pro Leu Asp Arg Arg Cys Val Arg Glu Cys Tyr	
	405 410 415	
15	tca ttt ggg atg gag aca ttg ttg aag ctt gat ttg aaa ggg act agg	1296
	Ser Phe Gly Met Glu Thr Leu Leu Lys Leu Asp Leu Lys Gly Thr Arg	
	420 425 430	
20	aga ttg ttt gac gct ttc ttt gat ctt gat cct aaa tac tgg caa ggg	1344
	Arg Leu Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Asp Pro Lys Tyr Trp Gln Gly	
	435 440 445	
25	ttc ctt tct tca aga ttg tct gtc aaa gaa ctt ggt tta ctc agc ttg	1392
	Phe Leu Ser Ser Arg Leu Ser Val Lys Glu Leu Gly Leu Leu Ser Leu	
	450 455 460	
	tgt ctt ttc gga cat ggc tca aac atg act agg ttg gat att gtt aca	1440
	Cys Leu Phe Gly His Gly Ser Asn Met Thr Arg Leu Asp Ile Val Thr	
	465 470 475 480	
30	aaa tgt cct ctt cct ttg gtt aga ctg att ggc aat cta gca ata gag	1488
	Lys Cys Pro Leu Pro Leu Val Arg Leu Ile Gly Asn Leu Ala Ile Glu	
	485 490 495	
35	agc ctt tgaatgtgaa aagtttgaat cattttcttc attttaattt ctttgattat	1544
	Ser Leu	
	tttcatatatt tctcaattgc aaaagtgaga taagagctac atactgtcaa caaataaact	1604
40	actattggaa agttaaaata tgtgtttggt gtatgttatt ctaatggaat ggattttgta	1664
	aa	1666
45	<210> 96	
	<211> 498	
	<212> PRT	
50		

## 123

&lt;213&gt; Lycopersicon esculentum

5 &lt;400&gt; 96

Met Glu Ala Leu Leu Lys Pro Phe Pro Ser Leu Leu Leu Ser Ser Pro  
 1 5 10 15

10

Thr Pro His Arg Ser Ile Phe Gln Gln Asn Pro Ser Phe Leu Ser Pro  
 20 25 30

15

Thr Thr Lys Lys Lys Ser Arg Lys Cys Leu Leu Arg Asn Lys Ser Ser  
 35 40 45

20

Lys Leu Phe Cys Ser Phe Leu Asp Leu Ala Pro Thr Ser Lys Pro Glu  
 50 55 60

25

Ser Leu Asp Val Asn Ile Ser Trp Val Asp Pro Asn Ser Asn Arg Ala  
 65 70 75 80

Gln Phe Asp Val Ile Ile Ile Gly Ala Gly Pro Ala Gly Leu Arg Leu  
 85 90 95

30

Ala Glu Gln Val Ser Lys Tyr Gly Ile Lys Val Cys Cys Val Asp Pro  
 100 105 110

35

Ser Pro Leu Ser Met Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val Asp Glu  
 115 120 125

40

Phe Glu Asn Leu Gly Leu Glu Asn Cys Leu Asp His Lys Trp Pro Met  
 130 135 140

45

Thr Cys Val His Ile Asn Asp Asn Lys Thr Lys Tyr Leu Gly Arg Pro  
 145 150 155 160

Tyr Gly Arg Val Ser Arg Lys Lys Leu Lys Leu Lys Leu Leu Asn Ser  
 165 170 175

50

## 124

	Cys Val Glu Asn Arg Val Lys Phe Tyr Lys Ala Lys Val Trp Lys Val	
	180	185 190
5	Glu His Glu Glu Phe Glu Ser Ser Ile Val Cys Asp Asp Gly Lys Lys	
	195	200 205
10	Ile Arg Gly Ser Leu Val Val Asp Ala Ser Gly Phe Ala Ser Asp Phe	
	210	215 220
15	Ile Glu Tyr Asp Arg Pro Arg Asn His Gly Tyr Gln Ile Ala His Gly	
	225	230 235 240
20	Val Leu Val Glu Val Asp Asn His Pro Phe Asp Leu Asp Lys Met Val	
	245	250 255
25	Leu Met Asp Trp Arg Asp Ser His Leu Gly Asn Glu Pro Tyr Leu Arg	
	260	265 270
30	Val Asn Asn Ala Lys Glu Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro Phe Asp	
	275	280 285
35	Arg Asp Leu Val Phe Leu Glu Glu Thr Ser Leu Val Ser Arg Pro Val	
	290	295 300
40	Leu Ser Tyr Met Glu Val Lys Arg Arg Met Val Ala Arg Leu Arg His	
	305	310 315 320
45	Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Val Ile Glu Glu Glu Lys Cys Val Ile	
	325	330 335
50	Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Arg Ile Pro Gln Asn Val Met Ala Ile	
	340	345 350
55	Gly Gly Asn Ser Gly Ile Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met Val Ala	
	355	360 365
60	Arg Ser Met Ala Leu Ala Pro Val Leu Ala Glu Ala Ile Val Glu Gly	
	370	375 380

125

Leu Gly Ser Thr Arg Met Ile Arg Gly Ser Gln Leu Tyr His Arg Val  
 385 390 395 400  
 5  
 Trp Asn Gly Leu Trp Pro Leu Asp Arg Arg Cys Val Arg Glu Cys Tyr  
 405 410 415  
 10  
 Ser Phe Gly Met Glu Thr Leu Leu Lys Leu Asp Leu Lys Gly Thr Arg  
 420 425 430  
 15  
 Arg Leu Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Asp Pro Lys Tyr Trp Gln Gly  
 435 440 445  
 20  
 Phe Leu Ser Ser Arg Leu Ser Val Lys Glu Leu Gly Leu Leu Ser Leu  
 450 455 460  
 25  
 Cys Leu Phe Gly His Gly Ser Asn Met Thr Arg Leu Asp Ile Val Thr  
 465 470 475 480  
 30  
 Lys Cys Pro Leu Pro Leu Val Arg Leu Ile Gly Asn Leu Ala Ile Glu  
 485 490 495  
 35  
 Ser Leu  
 40  
 <210> 97  
 <211> 1125  
 <212> DNA  
 45  
 <213> *Lycopersicon esculentum*  
 50  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (20) .. (946)



126

&lt;223&gt;

5	<400> 97		
	ttggatcatct ccacaatca atg gct gcc gcc gcc aga atc tcc gcc tcc tct	52	
	Met Ala Ala Ala Ala Arg Ile Ser Ala Ser Ser		
	1 5 10		
10	acc tca cga act ttt tat ttc cgt cat tca ccg ttt ctt ggc cca aaa	100	
	Thr Ser Arg Thr Phe Tyr Phe Arg His Ser Pro Phe Leu Gly Pro Lys		
	15 20 25		
	cct act tcg aca acc tca cat gtt tct cca atc tct cct ttt tct ctt	148	
15	Pro Thr Ser Thr Thr Ser His Val Ser Pro Ile Ser Pro Phe Ser Leu		
	30 35 40		
	aat cta ggc cca att ttg agg tct aga aga aaa ccc agt ttc act gtt	196	
	Asn Leu Gly Pro Ile Leu Arg Ser Arg Arg Lys Pro Ser Phe Thr Val		
20	45 50 55		
	tgc ttt gtt ctc gag gat gag aag ctg aaa cct caa ttt gac gat gag	244	
	Cys Phe Val Leu Glu Asp Glu Lys Leu Lys Pro Gln Phe Asp Asp Glu		
	60 65 70 75		
25	gct gag gat ttt gaa aag aag att gag gaa cag atc tta gct act cgc	292	
	Ala Glu Asp Phe Glu Lys Lys Ile Glu Glu Gln Ile Leu Ala Thr Arg		
	80 85 90		
30	ttg gcg gag aaa ctg gct agg aag aaa tcg gag agg ttt act tat ctt	340	
	Leu Ala Glu Lys Leu Ala Arg Lys Lys Ser Glu Arg Phe Thr Tyr Leu		
	95 100 105		
	gtg gct gct ata atg tct agt ttt ggg att act tct atg gct gtt atg	388	
35	Val Ala Ala Ile Met Ser Ser Phe Gly Ile Thr Ser Met Ala Val Met		
	110 115 120		
	gct gtt tat tac aga ttt tcg tgg caa atg gag gga gga gaa gtt cct	436	
	Ala Val Tyr Tyr Arg Phe Ser Trp Gln Met Glu Gly Gly Glu Val Pro		
40	125 130 135		
	gta acc gaa atg ttg ggt aca ttt gct ctc tct gtt ggt gct gct gta	484	
	Val Thr Glu Met Leu Gly Thr Phe Ala Leu Ser Val Gly Ala Ala Val		
	140 145 150 155		
45	gga atg gag ttt tgg gcg aga tgg gca cac aaa gca ctg tgg cat gct	532	
	Gly Met Glu Phe Trp Ala Arg Trp Ala His Lys Ala Leu Trp His Ala		
	160 165 170		
50	tca cta tgg cac atg cat gag tca cac cac aaa cca aga gaa gga cct	580	

## 127

[illegible]

&lt;400&gt; 98

5 Met Ala Ala Ala Ala Arg Ile Ser Ala Ser Ser Thr Ser Arg Thr Phe  
 1 5 10 15

10 Tyr Phe Arg His Ser Pro Phe Leu Gly Pro Lys Pro Thr Ser Thr Thr  
 20 25 30

15 Ser His Val Ser Pro Ile Ser Pro Phe Ser Leu Asn Leu Gly Pro Ile  
 35 40 45

20 Leu Arg Ser Arg Arg Lys Pro Ser Phe Thr Val Cys Phe Val Leu Glu  
 50 55 60

25 Asp Glu Lys Leu Lys Pro Gln Phe Asp Asp Glu Ala Glu Asp Phe Glu  
 65 70 75 80

30 Lys Lys Ile Glu Glu Gln Ile Leu Ala Thr Arg Leu Ala Glu Lys Leu  
 85 90 95

35 Ala Arg Lys Lys Ser Glu Arg Phe Thr Tyr Leu Val Ala Ala Ile Met  
 100 105 110

40 Ser Ser Phe Gly Ile Thr Ser Met Ala Val Met Ala Val Tyr Tyr Arg  
 115 120 125

45 Phe Ser Trp Gln Met Glu Gly Gly Glu Val Pro Val Thr Glu Met Leu  
 130 135 140

50 Gly Thr Phe Ala Leu Ser Val Gly Ala Ala Val Gly Met Glu Phe Trp  
 145 150 155 160

55 Ala Arg Trp Ala His Lys Ala Leu Trp His Ala Ser Leu Trp His Met  
 165 170 175

60 His Glu Ser His His Lys Pro Arg Glu Gly Pro Phe Glu Leu Asn Asp  
 180 185 190

Val Phe Ala Ile Thr Asn Ala Val Pro Ala Ile Ala Leu Leu Asn Tyr  
195 200 205

5

Gly Phe Phe His Lys Gly Leu Ile Ala Gly Leu Cys Phe Gly Ala Gly  
210 215 220

10

Leu Gly Ile Thr Val Phe Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly  
225 230 235 240

15

Leu Val His Lys Arg Phe Pro Val Gly Pro Val Ala Asn Val Pro Tyr  
245 250 255

20

Leu Arg Lys Val Ala Ala Ala His Ser Leu His His Ser Glu Lys Phe  
260 265 270

25

Asn Gly Val Pro Tyr Gly Leu Phe Phe Gly Pro Lys Glu Leu Glu Glu  
275 280 285

30

Val Gly Gly Thr Glu Glu Leu Glu Lys Glu Val Ile Arg Arg Thr Arg  
290 295 300

35

<210> 99

<211> 1779

<212> DNA

40

<213> Arabidopsis thaliana

45

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1779)

50

130

&lt;223&gt;

5	<400> 99	
	atg gat ctc cgt cgg agg cct cct aaa cca ccg gtt acc aac aac aac	48
	Met Asp Leu Arg Arg Arg Pro Pro Lys Pro Pro Val Thr Asn Asn Asn	
	1 5 10 15	
10	aac tcc aac gga tct ttc cgt tct tat cag cct cgc act tcc gat gac	96
	Asn Ser Asn Gly Ser Phe Arg Ser Tyr Gln Pro Arg Thr Ser Asp Asp	
	20 25 30	
15	gat cat cgt cgc cgg gct aca aca att gct cct cca ccg aaa gca tcc	144
	Asp His Arg Arg Arg Ala Thr Thr Ile Ala Pro Pro Pro Lys Ala Ser	
	35 40 45	
20	gac gcg ctt cct ctt ccg tta tat ctc aca aac gcc gtt ttc ttc acg	192
	Asp Ala Leu Pro Leu Pro Leu Tyr Leu Thr Asn Ala Val Phe Phe Thr	
	50 55 60	
25	ctc ttc ttc tcc gtc gcg tat tac ctc ctc cac ccg tgg cgt gac aag	240
	Leu Phe Phe Ser Val Ala Tyr Tyr Leu Leu His Arg Trp Arg Asp Lys	
	65 70 75 80	
	atc cgt tac aat acg cct ctt cac gtc gtc act atc aca gaa ctc ggc	288
	Ile Arg Tyr Asn Thr Pro Leu His Val Val Thr Ile Thr Glu Leu Gly	
	85 90 95	
30	gcc att att gct ctc atc gct tcg ttt atc tat ctc cta ggg ttt ttt	336
	Ala Ile Ile Ala Leu Ile Ala Ser Phe Ile Tyr Leu Leu Gly Phe Phe	
	100 105 110	
35	ggc att gac ttt gtt cag tca ttt atc tca cgt gcc tct ggt gat gct	384
	Gly Ile Asp Phe Val Gln Ser Phe Ile Ser Arg Ala Ser Gly Asp Ala	
	115 120 125	
40	tgg gat ctc gcc gat acg atc gat gat gat gac cac cgc ctt gtc acg	432
	Trp Asp Leu Ala Asp Thr Ile Asp Asp Asp Asp His Arg Leu Val Thr	
	130 135 140	
45	tgc tct cca ccg act ccg atc gtt tcc gtt gct aaa tta cct aat ccg	480
	Cys Ser Pro Pro Thr Pro Ile Val Ser Val Ala Lys Leu Pro Asn Pro	
	145 150 155 160	
	gaa cct att gtt acc gaa tcg ctt cct gag gaa gac gag gag att gtg	528
	Glu Pro Ile Val Thr Glu Ser Leu Pro Glu Glu Asp Glu Glu Ile Val	
	165 170 175	
50	aaa tcg gtt atc gac gga gtt att cca tcg tac tcg ctt gaa tct cgt	576

## 131

	Lys	Ser	Val	Ile	Asp	Gly	Val	Ile	Pro	Ser	Tyr	Ser	Leu	Glu	Ser	Arg	
				180					185					190			
5	ctc	ggt	gat	tgc	aaa	aga	gcg	gcg	tcg	att	cgt	cgt	gag	gcg	ttg	cag	624
	Leu	Gly	Asp	Cys	Lys	Arg	Ala	Ala	Ser	Ile	Arg	Arg	Glu	Ala	Leu	Gln	
			195					200					205				
10	aga	gtc	acc	ggg	aga	tcg	att	gaa	ggg	tta	ccg	ttg	gat	gga	ttt	gat	672
	Arg	Val	Thr	Gly	Arg	Ser	Ile	Glu	Gly	Leu	Pro	Leu	Asp	Gly	Phe	Asp	
		210					215					220					
15	tat	gaa	tcg	att	ttg	ggg	caa	tgc	tgt	gag	atg	cct	gtt	gga	tac	att	720
	Tyr	Glu	Ser	Ile	Leu	Gly	Gln	Cys	Cys	Glu	Met	Pro	Val	Gly	Tyr	Ile	
	225					230				235					240		
	cag	att	cct	gtt	ggg	att	gct	ggt	cca	ttg	ttg	ctt	gat	ggt	tat	gag	768
	Gln	Ile	Pro	Val	Gly	Ile	Ala	Gly	Pro	Leu	Leu	Leu	Asp	Gly	Tyr	Glu	
				245					250					255			
20	tac	tct	gtt	cct	atg	gct	aca	acc	gaa	ggt	tgt	ttg	gtt	gct	agc	act	816
	Tyr	Ser	Val	Pro	Met	Ala	Thr	Thr	Glu	Gly	Cys	Leu	Val	Ala	Ser	Thr	
			260						265				270				
25	aac	aga	ggc	tgc	aag	gct	atg	ttt	atc	tct	ggt	ggc	gcc	acc	agt	acc	864
	Asn	Arg	Gly	Cys	Lys	Ala	Met	Phe	Ile	Ser	Gly	Gly	Ala	Thr	Ser	Thr	
		275					280						285				
30	gtt	ctt	aag	gac	ggt	atg	acc	cga	gca	cct	gtt	gtt	cgg	ttc	gct	tcg	912
	Val	Leu	Lys	Asp	Gly	Met	Thr	Arg	Ala	Pro	Val	Val	Arg	Phe	Ala	Ser	
		290					295				300						
35	gcg	aga	cga	gct	tcg	gag	ctt	aag	ttt	ttc	ttg	gag	aat	cca	gag	aac	960
	Ala	Arg	Arg	Ala	Ser	Glu	Leu	Lys	Phe	Phe	Leu	Glu	Asn	Pro	Glu	Asn	
	305				310					315					320		
	ttt	gat	act	ttg	gca	gta	gtc	ttc	aac	agg	tcg	agt	aga	ttt	gca	aga	1008
	Phe	Asp	Thr	Leu	Ala	Val	Val	Phe	Asn	Arg	Ser	Ser	Arg	Phe	Ala	Arg	
				325				330						335			
40	ctg	caa	agt	gtt	aaa	tgc	aca	atc	gcg	ggg	aag	aat	gct	tat	gta	agg	1056
	Leu	Gln	Ser	Val	Lys	Cys	Thr	Ile	Ala	Gly	Lys	Asn	Ala	Tyr	Val	Arg	
			340					345					350				
45	ttc	tgt	tgt	agt	act	ggt	gat	gct	atg	ggg	atg	aat	atg	gtt	tct	aaa	1104
	Phe	Cys	Cys	Ser	Thr	Gly	Asp	Ala	Met	Gly	Met	Asn	Met	Val	Ser	Lys	
		355					360					365					
50	ggt	gtg	cag	aat	gtt	ctt	gag	tat	ctt	acc	gat	gat	ttc	cct	gac	atg	1152
	Gly	Val	Gln	Asn	Val	Leu	Glu	Tyr	Leu	Thr	Asp	Asp	Phe	Pro	Asp	Met	
		370				375					380						

## 132

5	gat gtg att gga atc tct ggt aac ttc tgt tcg gac aag aaa cct gct	1200
	Asp Val Ile Gly Ile Ser Gly Asn Phe Cys Ser Asp Lys Lys Pro Ala	
	385 390 395 400	
10	gct gtg aac tgg att gag gga cgt ggt aaa tca gtt gtt tgc gag gct	1248
	Ala Val Asn Trp Ile Glu Gly Arg Gly Lys Ser Val Val Cys Glu Ala	
	405 410 415	
15	gta atc aga gga gag atc gtg aac aag gtc ttg aaa acg agc gtg gct	1296
	Val Ile Arg Gly Glu Ile Val Asn Lys Val Leu Lys Thr Ser Val Ala	
	420 425 430	
20	gct tta gtc gag ctc aac atg ctc aag aac cta gct ggc tct gct gtt	1344
	Ala Leu Val Glu Leu Asn Met Leu Lys Asn Leu Ala Gly Ser Ala Val	
	435 440 445	
25	gca ggc tct cta ggt gga ttc aac gct cat gcc agt aac ata gtg tct	1392
	Ala Gly Ser Leu Gly Gly Phe Asn Ala His Ala Ser Asn Ile Val Ser	
	450 455 460	
30	gct gta ttc ata gct act ggc caa gat cca gct caa aac gtg gag agt	1440
	Ala Val Phe Ile Ala Thr Gly Gln Asp Pro Ala Gln Asn Val Glu Ser	
	465 470 475 480	
35	tct caa tgc atc acc atg atg gaa gct att aat gac ggc aaa gat atc	1488
	Ser Gln Cys Ile Thr Met Met Glu Ala Ile Asn Asp Gly Lys Asp Ile	
	485 490 495	
40	cat atc tca gtc act atg cca tct atc gag gtg ggg aca gtg gga gga	1536
	His Ile Ser Val Thr Met Pro Ser Ile Glu Val Gly Thr Val Gly Gly	
	500 505 510	
45	gga aca cag ctt gca tct caa tca gcg tgt tta aac ctg ctc gga gtt	1584
	Gly Thr Gln Leu Ala Ser Gln Ser Ala Cys Leu Asn Leu Leu Gly Val	
	515 520 525	
50	aaa gga gca agc aca gag tcg ccg gga atg aac gca agg agg cta gcg	1632
	Lys Gly Ala Ser Thr Glu Ser Pro Gly Met Asn Ala Arg Arg Leu Ala	
	530 535 540	
55	acg atc gta gcc gga gca gtt tta gct gga gag tta tct tta atg tca	1680
	Thr Ile Val Ala Gly Ala Val Leu Ala Gly Glu Leu Ser Leu Met Ser	
	545 550 555 560	
60	gca att gca gct gga cag ctt gtg aga agt cac atg aaa tac aat aga	1728
	Ala Ile Ala Ala Gly Gln Leu Val Arg Ser His Met Lys Tyr Asn Arg	
	565 570 575	
65	tcc agc cga gac atc tct gga gca acg aca acg aca aca aca aca	1776

## 133

Ser Ser Arg Asp Ile Ser Gly Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr  
 580 585 590

tga 1779

5

<210> 100

<211> 592

10

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

15

<400> 100

Met Asp Leu Arg Arg Arg Pro Pro Lys Pro Pro Val Thr Asn Asn Asn  
 1 5 10 15

Asn Ser Asn Gly Ser Phe Arg Ser Tyr Gln Pro Arg Thr Ser Asp Asp  
 20 25 30

25

Asp His Arg Arg Arg Ala Thr Thr Ile Ala Pro Pro Pro Lys Ala Ser  
 35 40 45

30

Asp Ala Leu Pro Leu Pro Leu Tyr Leu Thr Asn Ala Val Phe Phe Thr  
 50 55 60

35

Leu Phe Phe Ser Val Ala Tyr Tyr Leu Leu His Arg Trp Arg Asp Lys  
 65 70 75 80

40

Ile Arg Tyr Asn Thr Pro Leu His Val Val Thr Ile Thr Glu Leu Gly  
 85 90 95

45

Ala Ile Ile Ala Leu Ile Ala Ser Phe Ile Tyr Leu Leu Gly Phe Phe  
 100 105 110

Gly Ile Asp Phe Val Gln Ser Phe Ile Ser Arg Ala Ser Gly Asp Ala  
 115 120 125

50



## 134

	Trp	Asp	Leu	Ala	Asp	Thr	Ile	Asp	Asp	Asp	Asp	His	Arg	Leu	Val	Thr	
	130						135					140					
5	Cys	Ser	Pro	Pro	Thr	Pro	Ile	Val	Ser	Val	Ala	Lys	Leu	Pro	Asn	Pro	
	145					150					155				160		
10	Glu	Pro	Ile	Val	Thr	Glu	Ser	Leu	Pro	Glu	Glu	Asp	Glu	Glu	Ile	Val	
					165					170					175		
15	Lys	Ser	Val	Ile	Asp	Gly	Val	Ile	Pro	Ser	Tyr	Ser	Leu	Glu	Ser	Arg	
				180					185					190			
20	Leu	Gly	Asp	Cys	Lys	Arg	Ala	Ala	Ser	Ile	Arg	Arg	Glu	Ala	Leu	Gln	
		195						200					205				
25	Tyr	Glu	Ser	Ile	Leu	Gly	Gln	Cys	Cys	Glu	Met	Pro	Val	Gly	Tyr	Ile	
	225					230					235					240	
30	Gln	Ile	Pro	Val	Gly	Ile	Ala	Gly	Pro	Leu	Leu	Leu	Asp	Gly	Tyr	Glu	
					245					250					255		
35	Tyr	Ser	Val	Pro	Met	Ala	Thr	Thr	Glu	Gly	Cys	Leu	Val	Ala	Ser	Thr	
				260					265					270			
40	Asn	Arg	Gly	Cys	Lys	Ala	Met	Phe	Ile	Ser	Gly	Gly	Ala	Thr	Ser	Thr	
			275					280					285				
45	Val	Leu	Lys	Asp	Gly	Met	Thr	Arg	Ala	Pro	Val	Val	Arg	Phe	Ala	Ser	
		290					295					300					
50	Ala	Arg	Arg	Ala	Ser	Glu	Leu	Lys	Phe	Phe	Leu	Glu	Asn	Pro	Glu	Asn	
	305					310					315				320		
	Phe	Asp	Thr	Leu	Ala	Val	Val	Phe	Asn	Arg	Ser	Ser	Arg	Phe	Ala	Arg	
				325					330					335			

	Leu	Gln	Ser	Val	Lys	Cys	Thr	Ile	Ala	Gly	Lys	Asn	Ala	Tyr	Val	Arg	
				340						345					350		
5																	
	Phe	Cys	Cys	Ser	Thr	Gly	Asp	Ala	Met	Gly	Met	Asn	Met	Val	Ser	Lys	
			355					360					365				
10																	
	Gly	Val	Gln	Asn	Val	Leu	Glu	Tyr	Leu	Thr	Asp	Asp	Phe	Pro	Asp	Met	
		370					375					380					
15																	
	Asp	Val	Ile	Gly	Ile	Ser	Gly	Asn	Phe	Cys	Ser	Asp	Lys	Lys	Pro	Ala	
	385					390					395					400	
20																	
	Ala	Val	Asn	Trp	Ile	Glu	Gly	Arg	Gly	Lys	Ser	Val	Val	Cys	Glu	Ala	
				405						410					415		
25																	
	Val	Ile	Arg	Gly	Glu	Ile	Val	Asn	Lys	Val	Leu	Lys	Thr	Ser	Val	Ala	
				420					425					430			
30																	
	Ala	Leu	Val	Glu	Leu	Asn	Met	Leu	Lys	Asn	Leu	Ala	Gly	Ser	Ala	Val	
		435						440					445				
35																	
	Ala	Gly	Ser	Leu	Gly	Gly	Phe	Asn	Ala	His	Ala	Ser	Asn	Ile	Val	Ser	
		450					455					460					
40																	
	Ser	Gln	Cys	Ile	Thr	Met	Met	Glu	Ala	Ile	Asn	Asp	Gly	Lys	Asp	Ile	
				485						490					495		
45																	
	His	Ile	Ser	Val	Thr	Met	Pro	Ser	Ile	Glu	Val	Gly	Thr	Val	Gly	Gly	
			500						505					510			
50																	
	Gly	Thr	Gln	Leu	Ala	Ser	Gln	Ser	Ala	Cys	Leu	Asn	Leu	Leu	Gly	Val	
		515						520					525				

## 136

Lys Gly Ala Ser Thr Glu Ser Pro Gly Met Asn Ala Arg Arg Leu Ala  
 530 535 540

5 Thr Ile Val Ala Gly Ala Val Leu Ala Gly Glu Leu Ser Leu Met Ser  
 545 550 555 560

10 Ala Ile Ala Ala Gly Gln Leu Val Arg Ser His Met Lys Tyr Asn Arg  
 565 570 575

15 Ser Ser Arg Asp Ile Ser Gly Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr  
 580 585 590

<210> 101  
 <211> 1401  
 <212> DNA  
 <213> Arabidopsis thaliana ISPH

25  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1401)  
 <223>

35  
 <400> 101  
 atg gct gtt gcg ctc caa ttc agc cga tta tgc gtt cga ccg gat act 48  
 Met Ala Val Ala Leu Gln Phe Ser Arg Leu Cys Val Arg Pro Asp Thr  
 40 1 5 10 15  
 ttc gtg cgg gag aat cat ctc tct gga tcc gga tct ctc cgc cgc cgg 96  
 Phe Val Arg Glu Asn His Leu Ser Gly Ser Gly Ser Leu Arg Arg Arg  
 20 25 30  
 45  
 aaa gct tta tca gtc cgg tgc tcg tct ggc gat gag aac gct cct tcg 144  
 Lys Ala Leu Ser Val Arg Cys Ser Ser Gly Asp Glu Asn Ala Pro Ser  
 35 40 45  
 50 cca tcg gtg gtg atg gac tcc gat ttc gac gcc aag gtg ttc cgt aag 192

## 137

	Pro	Ser	Val	Val	Met	Asp	Ser	Asp	Phe	Asp	Ala	Lys	Val	Phe	Arg	Lys	
	50						55					60					
5	aac	ttg	acg	aga	agc	gat	aat	tac	aat	cgt	aaa	ggg	ttc	ggg	cat	aag	240
	Asn	Leu	Thr	Arg	Ser	Asp	Asn	Tyr	Asn	Arg	Lys	Gly	Phe	Gly	His	Lys	
	65					70				75					80		
10	gag	gag	aca	ctc	aag	ctc	atg	aat	cga	gag	tac	acc	agt	gat	ata	ttg	288
	Glu	Glu	Thr	Leu	Lys	Leu	Met	Asn	Arg	Glu	Tyr	Thr	Ser	Asp	Ile	Leu	
					85					90					95		
15	gag	aca	ctg	aaa	aca	aat	ggg	tat	act	tat	tct	tgg	gga	gat	gtt	act	336
	Glu	Thr	Leu	Lys	Thr	Asn	Gly	Tyr	Thr	Tyr	Ser	Trp	Gly	Asp	Val	Thr	
				100					105					110			
	gtg	aaa	ctc	gct	aaa	gca	tat	ggg	ttt	tgc	tgg	ggg	gtt	gag	cgt	gct	384
	Val	Lys	Leu	Ala	Lys	Ala	Tyr	Gly	Phe	Cys	Trp	Gly	Val	Glu	Arg	Ala	
				115				120					125				
20	gtt	cag	att	gca	tat	gaa	gca	cga	aag	cag	ttt	cca	gag	gag	agg	ctt	432
	Val	Gln	Ile	Ala	Tyr	Glu	Ala	Arg	Lys	Gln	Phe	Pro	Glu	Glu	Arg	Leu	
		130					135					140					
25	tgg	att	act	aac	gaa	atc	att	cat	aac	ccg	acc	gtc	aat	aag	agg	ttg	480
	Trp	Ile	Thr	Asn	Glu	Ile	Ile	His	Asn	Pro	Thr	Val	Asn	Lys	Arg	Leu	
	145				150					155					160		
30	gaa	gat	atg	gat	gtt	aaa	att	att	ccg	gtt	gag	gat	tca	aag	aaa	cag	528
	Glu	Asp	Met	Asp	Val	Lys	Ile	Ile	Pro	Val	Glu	Asp	Ser	Lys	Lys	Gln	
					165					170					175		
35	ttt	gat	gta	gta	gag	aaa	gat	gat	gtg	gtt	atc	ctt	cct	gcg	ttt	gga	576
	Phe	Asp	Val	Val	Glu	Lys	Asp	Asp	Val	Val	Ile	Leu	Pro	Ala	Phe	Gly	
				180					185					190			
	gct	ggg	gtt	gac	gag	atg	tat	gtt	ctt	aat	gat	aaa	aag	gtg	caa	att	624
	Ala	Gly	Val	Asp	Glu	Met	Tyr	Val	Leu	Asn	Asp	Lys	Lys	Val	Gln	Ile	
				195				200					205				
40	gtt	gac	acg	act	tgt	cct	tgg	gtg	aca	aag	gtc	tgg	aac	acg	gtt	gag	672
	Val	Asp	Thr	Thr	Cys	Pro	Trp	Val	Thr	Lys	Val	Trp	Asn	Thr	Val	Glu	
		210					215					220					
45	aag	cac	aag	aag	ggg	gaa	tac	aca	tca	gta	atc	cat	ggg	aaa	tat	aat	720
	Lys	His	Lys	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Ser	Val	Ile	His	Gly	Lys	Tyr	Asn	
	225					230					235				240		
50	cat	gaa	gag	acg	att	gca	act	gcg	tct	ttt	gca	gga	aag	tac	atc	att	768
	His	Glu	Glu	Thr	Ile	Ala	Thr	Ala	Ser	Phe	Ala	Gly	Lys	Tyr	Ile	Ile	
					245					250					255		

## 138

	gta aag aac atg aaa gag gca aat tac gtt tgt gat tac att ctc ggt	816
	Val Lys Asn Met Lys Glu Ala Asn Tyr Val Cys Asp Tyr Ile Leu Gly	
	260 265 270	
5	ggc caa tac gat gga tct agc tcc aca aaa gag gag ttc atg gag aaa	864
	Gly Gln Tyr Asp Gly Ser Ser Ser Thr Lys Glu Glu Phe Met Glu Lys	
	275 280 285	
10	ttc aaa tac gca att tcg aag ggt ttc gat ccc gac aat gac ctt gtc	912
	Phe Lys Tyr Ala Ile Ser Lys Gly Phe Asp Pro Asp Asn Asp Leu Val	
	290 295 300	
15	aaa gtt ggt att gca aac caa aca acg atg cta aag gga gaa aca gag	960
	Lys Val Gly Ile Ala Asn Gln Thr Thr Met Leu Lys Gly Glu Thr Glu	
	305 310 315 320	
20	gag ata gga aga tta ctc gag aca aca atg atg cgc aag tat gga gtg	1008
	Glu Ile Gly Arg Leu Leu Glu Thr Thr Met Met Arg Lys Tyr Gly Val	
	325 330 335	
25	gaa aat gta agc gga cat ttc atc agc ttc aac aca ata tgc gac gct	1056
	Glu Asn Val Ser Gly His Phe Ile Ser Phe Asn Thr Ile Cys Asp Ala	
	340 345 350	
	act caa gag cga caa gac gca atc tat gag cta gtg gaa gag aag att	1104
	Thr Gln Glu Arg Gln Asp Ala Ile Tyr Glu Leu Val Glu Glu Lys Ile	
	355 360 365	
30	gac ctc atg cta gtg gtt ggc gga tgg aat tca agt aac acc tct cac	1152
	Asp Leu Met Leu Val Val Gly Gly Trp Asn Ser Ser Asn Thr Ser His	
	370 375 380	
35	ctt cag gaa atc tca gag gca cgg gga atc cca tct tac tgg atc gat	1200
	Leu Gln Glu Ile Ser Glu Ala Arg Gly Ile Pro Ser Tyr Trp Ile Asp	
	385 390 395 400	
40	agt gag aaa cgg ata gga cct ggg aat aaa ata gcc tat aag ctc cac	1248
	Ser Glu Lys Arg Ile Gly Pro Gly Asn Lys Ile Ala Tyr Lys Leu His	
	405 410 415	
45	tat gga gaa ctg gtc gag aag gaa aac ttt ctc cca aag gga cca ata	1296
	Tyr Gly Glu Leu Val Glu Lys Glu Asn Phe Leu Pro Lys Gly Pro Ile	
	420 425 430	
	aca atc ggt gtg aca tca ggt gca tca acc ccg gat aag gtc gtg gaa	1344
	Thr Ile Gly Val Thr Ser Gly Ala Ser Thr Pro Asp Lys Val Val Glu	
	435 440 445	
50	gat gct ttg gtg aag gtg ttc gac att aaa cgt gaa gag tta ttg cag	1392

## 139

Asp Ala Leu Val Lys Val Phe Asp Ile Lys Arg Glu Glu Leu Leu Gln  
 450 455 460

5 ctg gct tga 1401  
 Leu Ala  
 465

10 <210> 102  
 <211> 466  
 <212> PRT

15 <213> Arabidopsis thaliana ISPH

20 <400> 102  
 Met Ala Val Ala Leu Gln Phe Ser Arg Leu Cys Val Arg Pro Asp Thr  
 1 5 10 15

25 Phe Val Arg Glu Asn His Leu Ser Gly Ser Gly Ser Leu Arg Arg Arg  
 20 25 30

30 Lys Ala Leu Ser Val Arg Cys Ser Ser Gly Asp Glu Asn Ala Pro Ser  
 35 40 45

35 Pro Ser Val Val Met Asp Ser Asp Phe Asp Ala Lys Val Phe Arg Lys  
 50 55 60

40 Asn Leu Thr Arg Ser Asp Asn Tyr Asn Arg Lys Gly Phe Gly His Lys  
 65 70 75 80

45 Glu Glu Thr Leu Lys Leu Met Asn Arg Glu Tyr Thr Ser Asp Ile Leu  
 85 90 95

50 Glu Thr Leu Lys Thr Asn Gly Tyr Thr Tyr Ser Trp Gly Asp Val Thr  
 100 105 110

Val Lys Leu Ala Lys Ala Tyr Gly Phe Cys Trp Gly Val Glu Arg Ala  
 115 120 125

140

5 Val Gln Ile Ala Tyr Glu Ala Arg Lys Gln Phe Pro Glu Glu Arg Leu  
 130 135 140

10 Trp Ile Thr Asn Glu Ile Ile His Asn Pro Thr Val Asn Lys Arg Leu  
 145 150 155 160

15 Glu Asp Met Asp Val Lys Ile Ile Pro Val Glu Asp Ser Lys Lys Gln  
 165 170 175

20 Phe Asp Val Val Glu Lys Asp Asp Val Val Ile Leu Pro Ala Phe Gly  
 180 185 190

25 Ala Gly Val Asp Glu Met Tyr Val Leu Asn Asp Lys Lys Val Gln Ile  
 195 200 205

30 Val Asp Thr Thr Cys Pro Trp Val Thr Lys Val Trp Asn Thr Val Glu  
 210 215 220

35 Lys His Lys Lys Gly Glu Tyr Thr Ser Val Ile His Gly Lys Tyr Asn  
 225 230 235 240

40 His Glu Glu Thr Ile Ala Thr Ala Ser Phe Ala Gly Lys Tyr Ile Ile  
 245 250 255

45 Val Lys Asn Met Lys Glu Ala Asn Tyr Val Cys Asp Tyr Ile Leu Gly  
 260 265 270

50 Gly Gln Tyr Asp Gly Ser Ser Ser Thr Lys Glu Glu Phe Met Glu Lys  
 275 280 285

Phe Lys Tyr Ala Ile Ser Lys Gly Phe Asp Pro Asp Asn Asp Leu Val  
 290 295 300

Lys Val Gly Ile Ala Asn Gln Thr Thr Met Leu Lys Gly Glu Thr Glu  
 305 310 315 320

## 141

Glu Ile Gly Arg Leu Leu Glu Thr Thr Met Met Arg Lys Tyr Gly Val  
325 330 335

5 Glu Asn Val Ser Gly His Phe Ile Ser Phe Asn Thr Ile Cys Asp Ala  
340 345 350

10 Thr Gln Glu Arg Gln Asp Ala Ile Tyr Glu Leu Val Glu Glu Lys Ile  
355 360 365

15 Asp Leu Met Leu Val Val Gly Gly Trp Asn Ser Ser Asn Thr Ser His  
370 375 380

20 Leu Gln Glu Ile Ser Glu Ala Arg Gly Ile Pro Ser Tyr Trp Ile Asp  
385 390 395 400

Ser Glu Lys Arg Ile Gly Pro Gly Asn Lys Ile Ala Tyr Lys Leu His  
405 410 415

25 Tyr Gly Glu Leu Val Glu Lys Glu Asn Phe Leu Pro Lys Gly Pro Ile  
420 425 430

30 Thr Ile Gly Val Thr Ser Gly Ala Ser Thr Pro Asp Lys Val Val Glu  
435 440 445

35 Asp Ala Leu Val Lys Val Phe Asp Ile Lys Arg Glu Glu Leu Leu Gln  
450 455 460

Leu Ala  
465

40 <210> 103

<211> 2160

45 <212> DNA

<213> Lycopersicon esculentum



142

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

5 &lt;222&gt; (1) .. (2160)

&lt;223&gt;

10

&lt;400&gt; 103

atg gct ttg tgt gct tat gca ttt cct ggg att ttg aac agg act ggt	48
Met Ala Leu Cys Ala Tyr Ala Phe Pro Gly Ile Leu Asn Arg Thr Gly	
1 5 10 15	

15

gtg gtt tca gat tct tct aag gca acc cct ttg ttc tct gga tgg att	96
Val Val Ser Asp Ser Ser Lys Ala Thr Pro Leu Phe Ser Gly Trp Ile	
20 25 30	

20

cat gga aca gat ctg cag ttt ttg ttc caa cac aag ctt act cat gag	144
His Gly Thr Asp Leu Gln Phe Leu Phe Gln His Lys Leu Thr His Glu	
35 40 45	

25

gtc aag aaa agg tca cgt gtg gtt cag gct tcc tta tca gaa tct gga	192
Val Lys Lys Arg Ser Arg Val Val Gln Ala Ser Leu Ser Glu Ser Gly	
50 55 60	

30

gaa tac tac aca cag aga ccg cca acg cct att ttg gac act gtg aac	240
Glu Tyr Tyr Thr Gln Arg Pro Pro Thr Pro Ile Leu Asp Thr Val Asn	
65 70 75 80	

35

tat ccc att cat atg aaa aat ctg tct ctg aag gaa ctt aaa caa cta	288
Tyr Pro Ile His Met Lys Asn Leu Ser Leu Lys Glu Leu Lys Gln Leu	
85 90 95	

40

gca gat gaa cta agg tca gat aca att ttc aat gta tca aag act ggg	336
Ala Asp Glu Leu Arg Ser Asp Thr Ile Phe Asn Val Ser Lys Thr Gly	
100 105 110	

45

ggt cac ctt ggc tca agt ctt ggt gtt gtt gag ctg act gtt gct ctt	384
Gly His Leu Gly Ser Ser Leu Gly Val Val Glu Leu Thr Val Ala Leu	
115 120 125	

cat tat gtc ttc aat gca ccg caa gat agg att ctc tgg gat gtt ggt	432
His Tyr Val Phe Asn Ala Pro Gln Asp Arg Ile Leu Trp Asp Val Gly	
130 135 140	

50

cat cag tct tat cct cac aaa atc ttg act ggt aga agg gac aag atg	480
His Gln Ser Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Lys Met	
145 150 155 160	

## 143

5	tcg aca tta agg cag aca gat ggt ctt gca gga ttt act aag cga tcg	528
	Ser Thr Leu Arg Gln Thr Asp Gly Leu Ala Gly Phe Thr Lys Arg Ser	
	165 170 175	
	gag agt gaa tat gat tgc ttt ggc acc ggc cac agt tcc acc acc atc	576
	Glu Ser Glu Tyr Asp Cys Phe Gly Thr Gly His Ser Ser Thr Thr Ile	
10	180 185 190	
	tca gca ggc cta ggg atg gct gtt ggt aga gat cta aaa gga aga aac	624
	Ser Ala Gly Leu Gly Met Ala Val Gly Arg Asp Leu Lys Gly Arg Asn	
	195 200 205	
	aac aat gtt att gcc gta ata ggt gat ggt gcc atg aca gca ggt caa	672
15	Asn Asn Val Ile Ala Val Ile Gly Asp Gly Ala Met Thr Ala Gly Gln	
	210 215 220	
	gct tat gaa gcc atg aat aat gct ggt tac ctg gac tct gac atg att	720
	Ala Tyr Glu Ala Met Asn Asn Ala Gly Tyr Leu Asp Ser Asp Met Ile	
	225 230 235 240	
20	ggt atc tta aac gac aat aga caa gtt tct tta cct act gct act ctg	768
	Val Ile Leu Asn Asp Asn Arg Gln Val Ser Leu Pro Thr Ala Thr Leu	
	245 250 255	
	gat ggg cca gtt gct cct gtt gga gct cta agt agt gct ttg agc agg	816
	Asp Gly Pro Val Ala Pro Val Gly Ala Leu Ser Ser Ala Leu Ser Arg	
25	260 265 270	
	tta cag tct aat agg cct ctc aga gaa cta aga gaa gtc gca aag gga	864
	Leu Gln Ser Asn Arg Pro Leu Arg Glu Leu Arg Glu Val Ala Lys Gly	
	275 280 285	
	ggt act aag cag att ggt ggt cct atg cat gag ctt gct gca aaa gtt	912
30	Val Thr Lys Gln Ile Gly Gly Pro Met His Glu Leu Ala Ala Lys Val	
	290 295 300	
	gat gaa tat gct cgt ggc atg att agt ggt tct gga tca aca ttg ttt	960
	Asp Glu Tyr Ala Arg Gly Met Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Leu Phe	
	305 310 315 320	
35	gaa gaa ctt gga ctt tac tat att ggt cct gtg gat ggt cac aac att	1008
	Glu Glu Leu Gly Leu Tyr Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly His Asn Ile	
	325 330 335	
	gat gat cta att gcg att ctc aaa gag gtt aga agt act aaa aca aca	1056
	Asp Asp Leu Ile Ala Ile Leu Lys Glu Val Arg Ser Thr Lys Thr Thr	
40	340 345 350	
	ggt cca gta ctg atc cat gtt gtc act gag aaa ggc aga ggt tat cca	1104

## 144

	Gly	Pro	Val	Leu	Ile	His	Val	Val	Thr	Glu	Lys	Gly	Arg	Gly	Tyr	Pro	
			355					360					365				
5	tat	gct	gag	aga	gct	gca	gat	aag	tat	cat	gga	gtt	gcc	aag	ttt	gat	1152
	Tyr	Ala	Glu	Arg	Ala	Ala	Asp	Lys	Tyr	His	Gly	Val	Ala	Lys	Phe	Asp	
			370				375					380					
10	cca	gca	aca	gga	aag	caa	ttc	aaa	gcc	agt	gcc	aag	aca	cag	tcc	tat	1200
	Pro	Ala	Thr	Gly	Lys	Gln	Phe	Lys	Ala	Ser	Ala	Lys	Thr	Gln	Ser	Tyr	
			385			390					395					400	
15	aca	aca	tat	ttt	gcc	gag	gct	tta	att	gca	gaa	gca	gaa	gca	gat	aaa	1248
	Thr	Thr	Tyr	Phe	Ala	Glu	Ala	Leu	Ile	Ala	Glu	Ala	Glu	Ala	Asp	Lys	
					405					410					415		
	gac	att	gtt	gca	atc	cat	gct	gcc	atg	ggg	ggg	ggg	acc	gga	atg	aac	1296
	Asp	Ile	Val	Ala	Ile	His	Ala	Ala	Met	Gly	Gly	Gly	Thr	Gly	Met	Asn	
				420				425						430			
20	ctt	ttc	cat	cgt	cgc	ttc	cca	aca	agg	tgt	ttt	gat	gtt	gga	ata	gca	1344
	Leu	Phe	His	Arg	Arg	Phe	Pro	Thr	Arg	Cys	Phe	Asp	Val	Gly	Ile	Ala	
				435			440						445				
25	gaa	caa	cat	gca	gta	acc	ttt	gct	gct	gga	ttg	gct	tgt	gaa	ggc	att	1392
	Glu	Gln	His	Ala	Val	Thr	Phe	Ala	Ala	Gly	Leu	Ala	Cys	Glu	Gly	Ile	
			450				455					460					
30	aaa	cct	ttc	tgt	gca	atc	tat	tcg	tct	ttc	atg	cag	agg	gct	tat	gac	1440
	Lys	Pro	Phe	Cys	Ala	Ile	Tyr	Ser	Ser	Phe	Met	Gln	Arg	Ala	Tyr	Asp	
			465			470					475				480		
35	cag	gta	gtg	cat	gac	gtt	gat	ttg	caa	aag	ctg	ccc	gtg	agg	ttt	gca	1488
	Gln	Val	Val	His	Asp	Val	Asp	Leu	Gln	Lys	Leu	Pro	Val	Arg	Phe	Ala	
					485					490					495		
	atg	gac	aga	gca	ggg	ctt	gtt	gga	gca	gat	ggg	cca	aca	cat	tgt	ggg	1536
	Met	Asp	Arg	Ala	Gly	Leu	Val	Gly	Ala	Asp	Gly	Pro	Thr	His	Cys	Gly	
				500				505					510				
40	gca	ttt	gat	gtt	act	tac	atg	gca	tgt	ctt	cct	aac	atg	gtt	gta	atg	1584
	Ala	Phe	Asp	Val	Thr	Tyr	Met	Ala	Cys	Leu	Pro	Asn	Met	Val	Val	Met	
				515				520					525				
45	gct	cct	tct	gat	gaa	gcg	gag	cta	ttt	cac	atg	gta	gca	act	gct	gcc	1632
	Ala	Pro	Ser	Asp	Glu	Ala	Glu	Leu	Phe	His	Met	Val	Ala	Thr	Ala	Ala	
			530				535					540					
50	gcc	att	gat	gac	aga	cca	agt	tgt	ttt	aga	tac	cca	aga	gga	aat	ggg	1680
	Ala	Ile	Asp	Asp	Arg	Pro	Ser	Cys	Phe	Arg	Tyr	Pro	Arg	Gly	Asn	Gly	
			545			550				555					560		

## 145

	atc ggt gta gag ctt ccg gct gga aac aaa gga att cct ctt gag gtt	1728
	Ile Gly Val Glu Leu Pro Ala Gly Asn Lys Gly Ile Pro Leu Glu Val	
	565 570 575	
5	ggt aaa ggt agg ata ttg att gag ggg gag aga gtg gct cta ttg gga	1776
	Gly Lys Gly Arg Ile Leu Ile Glu Gly Glu Arg Val Ala Leu Leu Gly	
	580 585 590	
10	tat ggc tca gca gtg cag aac tgt ttg gat gct gct att gtg cta gaa	1824
	Tyr Gly Ser Ala Val Gln Asn Cys Leu Asp Ala Ala Ile Val Leu Glu	
	595 600 605	
15	tcc cgc ggc tta caa gta aca gtt gca gat gca cgt ttc tgc aaa cca	1872
	Ser Arg Gly Leu Gln Val Thr Val Ala Asp Ala Arg Phe Cys Lys Pro	
	610 615 620	
20	ctg gac cat gcc ctc ata agg agc ctt gca aaa tca cat gaa gtg cta	1920
	Leu Asp His Ala Leu Ile Arg Ser Leu Ala Lys Ser His Glu Val Leu	
	625 630 635 640	
25	atc act gtc gaa gaa gga tca att gga ggt ttt gga tct cat gtt gtt	1968
	Ile Thr Val Glu Glu Gly Ser Ile Gly Gly Phe Gly Ser His Val Val	
	645 650 655	
	cag ttc atg gcc tta gat ggg ctt ctt gat ggc aag ttg aag tgg aga	2016
	Gln Phe Met Ala Leu Asp Gly Leu Leu Asp Gly Lys Leu Lys Trp Arg	
	660 665 670	
30	cca ata gtt ctt cct gat cga tac att gac cat gga tct cct gtt gat	2064
	Pro Ile Val Leu Pro Asp Arg Tyr Ile Asp His Gly Ser Pro Val Asp	
	675 680 685	
35	cag ttg gcg gaa gct ggc cta aca cca tct cac att gca gca aca gta	2112
	Gln Leu Ala Glu Ala Gly Leu Thr Pro Ser His Ile Ala Ala Thr Val	
	690 695 700	
40	ttt aac ata ctt gga caa acc aga gag gct cta gag gtc atg aca taa	2160
	Phe Asn Ile Leu Gly Gln Thr Arg Glu Ala Leu Glu Val Met Thr	
	705 710 715	
	<210> 104	
45	<211> 719	
	<212> PRT	
50	<213> Lycopersicon esculentum	

:

.

.

146

&lt;400&gt; 104

5 Met Ala Leu Cys Ala Tyr Ala Phe Pro Gly Ile Leu Asn Arg Thr Gly  
 1 5 10 15

10 Val Val Ser Asp Ser Ser Lys Ala Thr Pro Leu Phe Ser Gly Trp Ile  
 20 25 30

15 His Gly Thr Asp Leu Gln Phe Leu Phe Gln His Lys Leu Thr His Glu  
 35 40 45

20 Val Lys Lys Arg Ser Arg Val Val Gln Ala Ser Leu Ser Glu Ser Gly  
 50 55 60

25 Glu Tyr Tyr Thr Gln Arg Pro Pro Thr Pro Ile Leu Asp Thr Val Asn  
 65 70 75 80

30 Tyr Pro Ile His Met Lys Asn Leu Ser Leu Lys Glu Leu Lys Gln Leu  
 85 90 95

35 Ala Asp Glu Leu Arg Ser Asp Thr Ile Phe Asn Val Ser Lys Thr Gly  
 100 105 110

40 Gly His Leu Gly Ser Ser Leu Gly Val Val Glu Leu Thr Val Ala Leu  
 115 120 125

45 His Tyr Val Phe Asn Ala Pro Gln Asp Arg Ile Leu Trp Asp Val Gly  
 130 135 140

50 His Gln Ser Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Lys Met  
 145 150 155 160

55 Ser Thr Leu Arg Gln Thr Asp Gly Leu Ala Gly Phe Thr Lys Arg Ser  
 165 170 175

60 Glu Ser Glu Tyr Asp Cys Phe Gly Thr Gly His Ser Ser Thr Thr Ile  
 180 185 190

147

Ser Ala Gly Leu Gly Met Ala Val Gly Arg Asp Leu Lys Gly Arg Asn  
 195 200 205  
 5

Asn Asn Val Ile Ala Val Ile Gly Asp Gly Ala Met Thr Ala Gly Gln  
 210 215 220  
 10

Ala Tyr Glu Ala Met Asn Asn Ala Gly Tyr Leu Asp Ser Asp Met Ile  
 225 230 235 240  
 15

Val Ile Leu Asn Asp Asn Arg Gln Val Ser Leu Pro Thr Ala Thr Leu  
 245 250 255  
 20

Asp Gly Pro Val Ala Pro Val Gly Ala Leu Ser Ser Ala Leu Ser Arg  
 260 265 270  
 25

Leu Gln Ser Asn Arg Pro Leu Arg Glu Leu Arg Glu Val Ala Lys Gly  
 275 280 285  
 30

Val Thr Lys Gln Ile Gly Gly Pro Met His Glu Leu Ala Ala Lys Val  
 290 295 300  
 35

Asp Glu Tyr Ala Arg Gly Met Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Leu Phe  
 305 310 315 320  
 40

Glu Glu Leu Gly Leu Tyr Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly His Asn Ile  
 325 330 335  
 45

Asp Asp Leu Ile Ala Ile Leu Lys Glu Val Arg Ser Thr Lys Thr Thr  
 340 345 350  
 50

Gly Pro Val Leu Ile His Val Val Thr Glu Lys Gly Arg Gly Tyr Pro  
 355 360 365  
 50

Tyr Ala Glu Arg Ala Ala Asp Lys Tyr His Gly Val Ala Lys Phe Asp  
 370 375 380

## 148

	Pro	Ala	Thr	Gly	Lys	Gln	Phe	Lys	Ala	Ser	Ala	Lys	Thr	Gln	Ser	Tyr	
	385					390				395						400	
5	Thr	Thr	Tyr	Phe	Ala	Glu	Ala	Leu	Ile	Ala	Glu	Ala	Glu	Ala	Asp	Lys	
					405					410					415		
10	Asp	Ile	Val	Ala	Ile	His	Ala	Ala	Met	Gly	Gly	Gly	Thr	Gly	Met	Asn	
				420					425						430		
15	Leu	Phe	His	Arg	Arg	Phe	Pro	Thr	Arg	Cys	Phe	Asp	Val	Gly	Ile	Ala	
			435					440						445			
20	Glu	Gln	His	Ala	Val	Thr	Phe	Ala	Ala	Gly	Leu	Ala	Cys	Glu	Gly	Ile	
		450					455					460					
25	Lys	Pro	Phe	Cys	Ala	Ile	Tyr	Ser	Ser	Phe	Met	Gln	Arg	Ala	Tyr	Asp	
	465					470					475					480	
30	Gln	Val	Val	His	Asp	Val	Asp	Leu	Gln	Lys	Leu	Pro	Val	Arg	Phe	Ala	
					485					490					495		
35	Met	Asp	Arg	Ala	Gly	Leu	Val	Gly	Ala	Asp	Gly	Pro	Thr	His	Cys	Gly	
				500					505					510			
40	Ala	Phe	Asp	Val	Thr	Tyr	Met	Ala	Cys	Leu	Pro	Asn	Met	Val	Val	Met	
			515					520					525				
45	Ala	Pro	Ser	Asp	Glu	Ala	Glu	Leu	Phe	His	Met	Val	Ala	Thr	Ala	Ala	
		530					535					540					
50	Ala	Ile	Asp	Asp	Arg	Pro	Ser	Cys	Phe	Arg	Tyr	Pro	Arg	Gly	Asn	Gly	
	545					550				555						560	
55	Ile	Gly	Val	Glu	Leu	Pro	Ala	Gly	Asn	Lys	Gly	Ile	Pro	Leu	Glu	Val	
				565						570					575		
60	Gly	Lys	Gly	Arg	Ile	Leu	Ile	Glu	Gly	Glu	Arg	Val	Ala	Leu	Leu	Gly	
				580					585					590			

5 Tyr Gly Ser Ala Val Gln Asn Cys Leu Asp Ala Ala Ile Val Leu Glu  
595 600 605

10 Ser Arg Gly Leu Gln Val Thr Val Ala Asp Ala Arg Phe Cys Lys Pro  
610 615 620

15 Leu Asp His Ala Leu Ile Arg Ser Leu Ala Lys Ser His Glu Val Leu  
625 630 635 640

20 Ile Thr Val Glu Glu Gly Ser Ile Gly Gly Phe Gly Ser His Val Val  
645 650 655

25 Gln Phe Met Ala Leu Asp Gly Leu Leu Asp Gly Lys Leu Lys Trp Arg  
660 665 670

30 Pro Ile Val Leu Pro Asp Arg Tyr Ile Asp His Gly Ser Pro Val Asp  
675 680 685

35 Gln Leu Ala Glu Ala Gly Leu Thr Pro Ser His Ile Ala Ala Thr Val  
690 695 700

40 Phe Asn Ile Leu Gly Gln Thr Arg Glu Ala Leu Glu Val Met Thr  
705 710 715

45 <210> 105

<211> 1434

<212> DNA

40 <213> Arabidopsis thaliana

45 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(1434)

50



150

<223>

[illegible]

## 151

	Val Thr Gly Ile Val Gly Cys Ala Gly Leu Lys Pro Thr Val Ala Ala	
	180 185 190	
5	att gaa gca gga aag gac att gct ctt gca aac aaa gag aca tta atc Ile Glu Ala Gly Lys Asp Ile Ala Leu Ala Asn Lys Glu Thr Leu Ile	624
	195 200 205	
10	gca ggt ggt cct ttc gtg ctt ccg ctt gcc aac aaa cat aat gta aag Ala Gly Gly Pro Phe Val Leu Pro Leu Ala Asn Lys His Asn Val Lys	672
	210 215 220	
15	att ctt ccg gca gat tca gaa cat tct gcc ata ttt cag tgt att caa Ile Leu Pro Ala Asp Ser Glu His Ser Ala Ile Phe Gln Cys Ile Gln	720
	225 230 235 240	
	ggt ttg cct gaa ggc gct ctg cgc aag ata atc ttg act gca tct ggt Gly Leu Pro Glu Gly Ala Leu Arg Lys Ile Ile Leu Thr Ala Ser Gly	768
	245 250 255	
20	gga gct ttt agg gat tgg cct gtc gaa aag cta aag gaa gtt aaa gta Gly Ala Phe Arg Asp Trp Pro Val Glu Lys Leu Lys Glu Val Lys Val	816
	260 265 270	
25	gcg gat gcg ttg aag cat cca aac tgg aac atg gga aag aaa atc act Ala Asp Ala Leu Lys His Pro Asn Trp Asn Met Gly Lys Lys Ile Thr	864
	275 280 285	
30	gtg gac tct gct acg ctt ttc aac aag ggt ctt gag gtc att gaa gcg Val Asp Ser Ala Thr Leu Phe Asn Lys Gly Leu Glu Val Ile Glu Ala	912
	290 295 300	
35	cat tat ttg ttt gga gct gag tat gac gat ata gag att gtc att cat His Tyr Leu Phe Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Ile Glu Ile Val Ile His	960
	305 310 315 320	
	ccg caa agt atc ata cat tcc atg att gaa aca cag gat tca tct gtg Pro Gln Ser Ile Ile His Ser Met Ile Glu Thr Gln Asp Ser Ser Val	1008
	325 330 335	
40	ctt gct caa ttg ggt tgg cct gat atg cgt tta ccg att ctc tac acc Leu Ala Gln Leu Gly Trp Pro Asp Met Arg Leu Pro Ile Leu Tyr Thr	1056
	340 345 350	
45	atg tca tgg ccc gat aga gtt cct tgt tct gaa gta act tgg cca aga Met Ser Trp Pro Asp Arg Val Pro Cys Ser Glu Val Thr Trp Pro Arg	1104
	355 360 365	
50	ctt gac ctt tgc aaa ctc ggt tca ttg act ttc aag aaa cca gac aat Leu Asp Leu Cys Lys Leu Gly Ser Leu Thr Phe Lys Lys Pro Asp Asn	1152
	370 375 380	

152

	gtg	aaa	tac	cca	tcc	atg	gat	ctt	gct	tat	gct	gct	gga	cga	gct	gga	1200
	Val	Lys	Tyr	Pro	Ser	Met	Asp	Leu	Ala	Tyr	Ala	Ala	Gly	Arg	Ala	Gly	
	385					390					395					400	
5	ggc	aca	atg	act	gga	gtt	ctc	agc	gcc	gcc	aat	gag	aaa	gct	gtt	gaa	1248
	Gly	Thr	Met	Thr	Gly	Val	Leu	Ser	Ala	Ala	Asn	Glu	Lys	Ala	Val	Glu	
					405					410						415	
10	atg	ttc	att	gat	gaa	aag	ata	agc	tat	ttg	gat	atc	ttc	aag	gtt	gtg	1296
	Met	Phe	Ile	Asp	Glu	Lys	Ile	Ser	Tyr	Leu	Asp	Ile	Phe	Lys	Val	Val	
					420					425					430		
15	gaa	tta	aca	tgc	gat	aaa	cat	cga	aac	gag	ttg	gta	aca	tca	ccg	tct	1344
	Glu	Leu	Thr	Cys	Asp	Lys	His	Arg	Asn	Glu	Leu	Val	Thr	Ser	Pro	Ser	
					435				440						445		
20	ctt	gaa	gag	att	gtt	cac	tat	gac	ttg	tgg	gca	cgt	gaa	tat	gcc	gcg	1392
	Leu	Glu	Glu	Ile	Val	His	Tyr	Asp	Leu	Trp	Ala	Arg	Glu	Tyr	Ala	Ala	
		450					455					460					
25	aat	gtg	cag	ctt	tct	tct	ggg	gct	agg	cca	gtt	cat	gca	tga			1434
	Asn	Val	Gln	Leu	Ser	Ser	Gly	Ala	Arg	Pro	Val	His	Ala				
	465					470					475						
	<210>	106															
	<211>	477															
30	<212>	PRT															
	<213>	Arabidopsis thaliana															
35																	
	<400>	106															
40	Met	Met	Thr	Leu	Asn	Ser	Leu	Ser	Pro	Ala	Glu	Ser	Lys	Ala	Ile	Ser	
	1				5					10					15		
45	Phe	Leu	Asp	Thr	Ser	Arg	Phe	Asn	Pro	Ile	Pro	Lys	Leu	Ser	Gly	Gly	
				20					25					30			
50	Phe	Ser	Leu	Arg	Arg	Arg	Asn	Gln	Gly	Arg	Gly	Phe	Gly	Lys	Gly	Val	
			35					40					45				

## 153

	Lys	Cys	Ser	Val	Lys	Val	Gln	Gln	Gln	Gln	Pro	Pro	Pro	Ala	Trp	
	50						55				60					
5	Pro	Gly	Arg	Ala	Val	Pro	Glu	Ala	Pro	Arg	Gln	Ser	Trp	Asp	Gly	Pro
	65					70					75				80	
10	Lys	Pro	Ile	Ser	Ile	Val	Gly	Ser	Thr	Gly	Ser	Ile	Gly	Thr	Gln	Thr
					85					90					95	
15	Leu	Asp	Ile	Val	Ala	Glu	Asn	Pro	Asp	Lys	Phe	Arg	Val	Val	Ala	Leu
				100					105						110	
20	Ala	Ala	Gly	Ser	Asn	Val	Thr	Leu	Leu	Ala	Asp	Gln	Val	Arg	Arg	Phe
			115					120						125		
25	Lys	Pro	Ala	Leu	Val	Ala	Val	Arg	Asn	Glu	Ser	Leu	Ile	Asn	Glu	Leu
		130					135					140				
30	Glu	Gln	Gly	Val	Ile	Glu	Val	Ala	Arg	His	Pro	Glu	Ala	Val	Thr	Val
					165					170					175	
35	Val	Thr	Gly	Ile	Val	Gly	Cys	Ala	Gly	Leu	Lys	Pro	Thr	Val	Ala	Ala
				180					185					190		
40	Ile	Glu	Ala	Gly	Lys	Asp	Ile	Ala	Leu	Ala	Asn	Lys	Glu	Thr	Leu	Ile
		195						200					205			
45	Ala	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Leu	Pro	Leu	Ala	Asn	Lys	His	Asn	Val	Lys
		210					215					220				
50	Ile	Leu	Pro	Ala	Asp	Ser	Glu	His	Ser	Ala	Ile	Phe	Gln	Cys	Ile	Gln
	225					230					235				240	
	Gly	Leu	Pro	Glu	Gly	Ala	Leu	Arg	Lys	Ile	Ile	Leu	Thr	Ala	Ser	Gly
					245				250						255	

Gly Ala Phe Arg Asp Trp Pro Val Glu Lys Leu Lys Glu Val Lys Val  
 260 265 270  
 5

Ala Asp Ala Leu Lys His Pro Asn Trp Asn Met Gly Lys Lys Ile Thr  
 275 280 285

10

Val Asp Ser Ala Thr Leu Phe Asn Lys Gly Leu Glu Val Ile Glu Ala  
 290 295 300

15

His Tyr Leu Phe Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Ile Glu Ile Val Ile His  
 305 310 315 320

20

Pro Gln Ser Ile Ile His Ser Met Ile Glu Thr Gln Asp Ser Ser Val  
 325 330 335

25

Leu Ala Gln Leu Gly Trp Pro Asp Met Arg Leu Pro Ile Leu Tyr Thr  
 340 345 350

30

Met Ser Trp Pro Asp Arg Val Pro Cys Ser Glu Val Thr Trp Pro Arg  
 355 360 365

35

Val Lys Tyr Pro Ser Met Asp Leu Ala Tyr Ala Ala Gly Arg Ala Gly  
 385 390 395 400

40

Gly Thr Met Thr Gly Val Leu Ser Ala Ala Asn Glu Lys Ala Val Glu  
 405 410 415

45

Met Phe Ile Asp Glu Lys Ile Ser Tyr Leu Asp Ile Phe Lys Val Val  
 420 425 430

50

Glu Leu Thr Cys Asp Lys His Arg Asn Glu Leu Val Thr Ser Pro Ser  
 435 440 445

## 155

Leu Glu Glu Ile Val His Tyr Asp Leu Trp Ala Arg Glu Tyr Ala Ala  
 450 455 460

5 Asn Val Gln Leu Ser Ser Gly Ala Arg Pro Val His Ala  
 465 470 475

10 <210> 107

<211> 884

<212> DNA

15 <213> Adonis palaestina clone ApIPI28

20 <220>

<221> CDS

<222> (180) .. (884)

25 <223>

<400> 107  
 30 cgctcgatcag gattaatcct ttatatagta tcttctccac caccactaaa acattatcag 60  
 ctctcgtgttc ttctcccgct gttcatcttc agcagcggtg tcgtactctt tctatttctt 120  
 cttccatcac taacagtcct cgccgagggt tgaatcggct gttcgctca acgtcgact 179  
 35 atg ggt gaa gtc gct gat gct ggt atg gat gcc gtc cag aag cgg ctt 227  
 Met Gly Glu Val Ala Asp Ala Gly Met Asp Ala Val Gln Lys Arg Leu  
 1 5 10 15  
 40 atg ttc gac gat gaa tgt att ttg gtg gat gag aat gac aag gtc gtc 275  
 Met Phe Asp Asp Glu Cys Ile Leu Val Asp Glu Asn Asp Lys Val Val  
 20 25 30  
 gga cat gat tcc aaa tac aac tgt cat ttg atg gaa aag ata gag gca 323  
 45 Gly His Asp Ser Lys Tyr Asn Cys His Leu Met Glu Lys Ile Glu Ala  
 35 40 45  
 gaa aac ttg ctt cac aga gcc ttc agt gtt ttc tta ttc aac tca aaa 371  
 Glu Asn Leu Leu His Arg Ala Phe Ser Val Phe Leu Phe Asn Ser Lys  
 50 50 55 60

## 156

	tac gag ttg ctt ctt cag caa cga tct gca acg aag gta aca ttc ccg	419
	Tyr Glu Leu Leu Leu Gln Gln Arg Ser Ala Thr Lys Val Thr Phe Pro	
	65 70 75 80	
5	ctc gta tgg aca aac acc tgt tgc agc cat ccc ctc ttc cgt gat tcc	467
	Leu Val Trp Thr Asn Thr Cys Cys Ser His Pro Leu Phe Arg Asp Ser	
	85 90 95	
10	gaa ctc ata gaa gaa aat ttt ctc ggg gta cga aac gct gca caa agg	515
	Glu Leu Ile Glu Glu Asn Phe Leu Gly Val Arg Asn Ala Ala Gln Arg	
	100 105 110	
15	aag ctt tta gac gag cta ggc att cca gct gaa gac gta cca gtt gat	563
	Lys Leu Leu Asp Glu Leu Gly Ile Pro Ala Glu Asp Val Pro Val Asp	
	115 120 125	
20	gaa ttc act cct ctt ggt cgc att ctt tac aaa gct cca tct gac gga	611
	Glu Phe Thr Pro Leu Gly Arg Ile Leu Tyr Lys Ala Pro Ser Asp Gly	
	130 135 140	
25	aaa tgg gga gag cac gaa ctg gac tat ctt ctg ttt att gtc cga gat	659
	Lys Trp Gly Glu His Glu Leu Asp Tyr Leu Leu Phe Ile Val Arg Asp	
	145 150 155 160	
	gtg aaa tac gat cca aac cca gat gaa gtt gct gac gct aag tac gtt	707
	Val Lys Tyr Asp Pro Asn Pro Asp Glu Val Ala Asp Ala Lys Tyr Val	
	165 170 175	
30	aat cgc gag gag ttg aaa gag ata ctg aga aaa gct gat gca ggt gaa	755
	Asn Arg Glu Glu Leu Lys Glu Ile Leu Arg Lys Ala Asp Ala Gly Glu	
	180 185 190	
35	gag gga ata aag ttg tct cct tgg ttt aga ttg gtt gtg gat aac ttt	803
	Glu Gly Ile Lys Leu Ser Pro Trp Phe Arg Leu Val Val Asp Asn Phe	
	195 200 205	
40	ttg ttc aag tgg tgg gat cat gta gag gag ggg aag att aag gac gtc	851
	Leu Phe Lys Trp Trp Asp His Val Glu Glu Gly Lys Ile Lys Asp Val	
	210 215 220	
45	gcc gac atg aaa act atc cac aag ttg act taa	884
	Ala Asp Met Lys Thr Ile His Lys Leu Thr	
	225 230	
	<210> 108	
50	<211> 234	

157

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Adonis palaestina clone ApIP128

5

&lt;400&gt; 108

10 Met Gly Glu Val Ala Asp Ala Gly Met Asp Ala Val Gln Lys Arg Leu  
1 5 10 15

15 Met Phe Asp Asp Glu Cys Ile Leu Val Asp Glu Asn Asp Lys Val Val  
20 25 30

Gly His Asp Ser Lys Tyr Asn Cys His Leu Met Glu Lys Ile Glu Ala  
35 40 45

20 Glu Asn Leu Leu His Arg Ala Phe Ser Val Phe Leu Phe Asn Ser Lys  
50 55 60

25 Tyr Glu Leu Leu Leu Gln Gln Arg Ser Ala Thr Lys Val Thr Phe Pro  
65 70 75 80

30 Leu Val Trp Thr Asn Thr Cys Cys Ser His Pro Leu Phe Arg Asp Ser  
85 90 95

35 Glu Leu Ile Glu Glu Asn Phe Leu Gly Val Arg Asn Ala Ala Gln Arg  
100 105 110

Lys Leu Leu Asp Glu Leu Gly Ile Pro Ala Glu Asp Val Pro Val Asp  
115 120 125

40 Glu Phe Thr Pro Leu Gly Arg Ile Leu Tyr Lys Ala Pro Ser Asp Gly  
130 135 140

45 Lys Trp Gly Glu His Glu Leu Asp Tyr Leu Leu Phe Ile Val Arg Asp  
145 150 155 160

50 Val Lys Tyr Asp Pro Asn Pro Asp Glu Val Ala Asp Ala Lys Tyr Val  
165 170 175



158

Asn Arg Glu Glu Leu Lys Glu Ile Leu Arg Lys Ala Asp Ala Gly Glu  
 180 185 190  
 5

Glu Gly Ile Lys Leu Ser Pro Trp Phe Arg Leu Val Val Asp Asn Phe  
 195 200 205  
 10

Leu Phe Lys Trp Trp Asp His Val Glu Glu Gly Lys Ile Lys Asp Val  
 210 215 220  
 15

Ala Asp Met Lys Thr Ile His Lys Leu Thr  
 225 230  
 20

<210> 109  
 <211> 1402  
 <212> DNA  
 25 <213> Arabidopsis thaliana

<220>  
 30 <221> CDS  
 <222> (52)..(1317)  
 35 <223>

<400> 109  
 40 aagtctttgc ctctttgggtt tacttttctc tgttttcgat ccatttagaa a atg tta 57  
 Met Leu  
 1

ttc acg agg agt gtt gct cgg att tct tct aag ttt ctg aga aac cgt 105  
 45 Phe Thr Arg Ser Val Ala Arg Ile Ser Ser Lys Phe Leu Arg Asn Arg  
 5 10 15

agc ttc tat ggc tcc tct caa tct ctg gcc tct cat cgg ttc gca atc 153  
 50 Ser Phe Tyr Gly Ser Ser Gln Ser Leu Ala Ser His Arg Phe Ala Ile  
 20 25 30

## 159

5	att ccc gat cag ggt cac tct tgt tct gac tct cca cac aag ggt tac	201
	Ile Pro Asp Gln Gly His Ser Cys Ser Asp Ser Pro His Lys Gly Tyr	
	35 40 45 50	
	gtt tgc aga aca act tat tca ttg aaa tct ccg gtt ttt ggt gga ttt	249
	Val Cys Arg Thr Thr Tyr Ser Leu Lys Ser Pro Val Phe Gly Gly Phe	
10	55 60 65	
	agt cat caa ctc tat cac cag agt agc tcc ttg gtt gag gag gag ctt	297
	Ser His Gln Leu Tyr His Gln Ser Ser Ser Leu Val Glu Glu Glu Leu	
	70 75 80	
	gac cca ttt tcg ctt gtt gcc gat gag ctg tca ctt ctt agt aat aag	345
15	Asp Pro Phe Ser Leu Val Ala Asp Glu Leu Ser Leu Leu Ser Asn Lys	
	85 90 95	
	ttg aga gag atg gta ctt gcc gag gtt cca aag ctt gcc tct gct gct	393
	Leu Arg Glu Met Val Leu Ala Glu Val Pro Lys Leu Ala Ser Ala Ala	
	100 105 110	
20	gag tac ttc ttc aaa agg ggt gtg caa gga aaa cag ttt cgt tca act	441
	Glu Tyr Phe Phe Lys Arg Gly Val Gln Gly Lys Gln Phe Arg Ser Thr	
	115 120 125 130	
	att ttg ctg ctg atg gcg aca gct ctg gat gta cga gtt cca gaa gca	489
	Ile Leu Leu Leu Met Ala Thr Ala Leu Asp Val Arg Val Pro Glu Ala	
25	135 140 145	
	ttg att ggg gaa tca aca gat ata gtc aca tca gaa tta cgc gta agg	537
	Leu Ile Gly Glu Ser Thr Asp Ile Val Thr Ser Glu Leu Arg Val Arg	
	150 155 160	
	caa cgg ggt att gct gaa atc act gaa atg ata cac gtc gca agt cta	585
30	Gln Arg Gly Ile Ala Glu Ile Thr Glu Met Ile His Val Ala Ser Leu	
	165 170 175	
	ctg cac gat gat gtc ttg gat gat gcc gat aca agg cgt ggt gtt ggt	633
	Leu His Asp Asp Val Leu Asp Asp Ala Asp Thr Arg Arg Gly Val Gly	
	180 185 190	
35	tcc tta aat gtt gta atg ggt aac aag atg tcg gta tta gca gga gac	681
	Ser Leu Asn Val Val Met Gly Asn Lys Met Ser Val Leu Ala Gly Asp	
	195 200 205 210	
	ttc ttg ctc tcc cgg gct tgt ggg gct ctc gct gct tta aag aac aca	729
	Phe Leu Leu Ser Arg Ala Cys Gly Ala Leu Ala Ala Leu Lys Asn Thr	
40	215 220 225	
	gag gtt gta gca tta ctt gca act gct gta gaa cat ctt gtt acc ggt	777

## 160

[illegible]

161

ctcatttcat ttgtaggatt ttgttggtcc aattcgtttc acgaa 1402

5 <210> 110

<211> 422

<212> PRT

10 <213> Arabidopsis thaliana

15 <400> 110

Met Leu Phe Thr Arg Ser Val Ala Arg Ile Ser Ser Lys Phe Leu Arg  
1 5 10 15

20 Asn Arg Ser Phe Tyr Gly Ser Ser Gln Ser Leu Ala Ser His Arg Phe  
20 25 30

25 Ala Ile Ile Pro Asp Gln Gly His Ser Cys Ser Asp Ser Pro His Lys  
35 40 45

30 Gly Tyr Val Cys Arg Thr Thr Tyr Ser Leu Lys Ser Pro Val Phe Gly  
50 55 60

35 Gly Phe Ser His Gln Leu Tyr His Gln Ser Ser Ser Leu Val Glu Glu  
65 70 75 80

Glu Leu Asp Pro Phe Ser Leu Val Ala Asp Glu Leu Ser Leu Leu Ser  
85 90 95

40 Asn Lys Leu Arg Glu Met Val Leu Ala Glu Val Pro Lys Leu Ala Ser  
100 105 110

45 Ala Ala Glu Tyr Phe Phe Lys Arg Gly Val Gln Gly Lys Gln Phe Arg  
115 120 125

50 Ser Thr Ile Leu Leu Leu Met Ala Thr Ala Leu Asp Val Arg Val Pro  
130 135 140

## 162

5      Glu Ala Leu Ile Gly Glu Ser Thr Asp Ile Val Thr Ser Glu Leu Arg  
       145                                150                                155                                160

10      Val Arg Gln Arg Gly Ile Ala Glu Ile Thr Glu Met Ile His Val Ala  
    165                                170                                175

15      Ser Leu Leu His Asp Asp Val Leu Asp Asp Ala Asp Thr Arg Arg Gly  
    180                                185                                190

20      Val Gly Ser Leu Asn Val Val Met Gly Asn Lys Met Ser Val Leu Ala  
    195                                200                                205

25      Gly Asp Phe Leu Leu Ser Arg Ala Cys Gly Ala Leu Ala Ala Leu Lys  
    210                                215                                220

30      Asn Thr Glu Val Val Ala Leu Leu Ala Thr Ala Val Glu His Leu Val  
    225                                230                                235                                240

35      Thr Gly Glu Thr Met Glu Ile Thr Ser Ser Thr Glu Gln Arg Tyr Ser  
    245                                250                                255

40      Met Asp Tyr Tyr Met Gln Lys Thr Tyr Tyr Lys Thr Ala Ser Leu Ile  
    260                                265                                270

45      Ser Asn Ser Cys Lys Ala Val Ala Val Leu Thr Gly Gln Thr Ala Glu  
    275                                280                                285

50      Val Ala Val Leu Ala Phe Glu Tyr Gly Arg Asn Leu Gly Leu Ala Phe  
    290                                295                                300

55      Gln Leu Ile Asp Asp Ile Leu Asp Phe Thr Gly Thr Ser Ala Ser Leu  
    305                                310                                315                                320

60      Gly Lys Gly Ser Leu Ser Asp Ile Arg His Gly Val Ile Thr Ala Pro  
    325                                330                                335

## 163

Ile Leu Phe Ala Met Glu Glu Phe Pro Gln Leu Arg Glu Val Val Asp  
 340 345 350

5 Gln Val Glu Lys Asp Pro Arg Asn Val Asp Ile Ala Leu Glu Tyr Leu  
 355 360 365

10 Gly Lys Ser Lys Gly Ile Gln Arg Ala Arg Glu Leu Ala Met Glu His  
 370 375 380

15 Ala Asn Leu Ala Ala Ala Ala Ile Gly Ser Leu Pro Glu Thr Asp Asn  
 385 390 395 400

Glu Asp Val Lys Arg Ser Arg Arg Ala Leu Ile Asp Leu Thr His Arg  
 405 410 415

20 Val Ile Thr Arg Asn Lys  
 420

25 <210> 111  
 <211> 1155  
 <212> DNA  
 30 <213> Arabidopsis thaliana

35 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1) .. (1155)  
 40 <223>

45 <400> 111  
 atg agt gtg agt tgt tgt tgt agg aat ctg ggc aag aca ata aaa aag 48  
 Met Ser Val Ser Cys Cys Cys Arg Asn Leu Gly Lys Thr Ile Lys Lys  
 1 5 10 15

50 gca ata cct tca cat cat ttg cat ctg aga agt ctt ggt ggg agt ctc 96

## 164

	Ala	Ile	Pro	Ser	His	His	Leu	His	Leu	Arg	Ser	Leu	Gly	Ser	Leu		
	20				25				30								
5	tat	cgt	cgt	cgt	atc	caa	agc	tct	tca	atg	gag	acc	gat	ctc	aag	tca	144
	Tyr	Arg	Arg	Arg	Ile	Gln	Ser	Ser	Ser	Met	Glu	Thr	Asp	Leu	Lys	Ser	
	35				40				45								
10	acc	ttt	ctc	aac	gtt	tat	tct	gtt	ctc	aag	tct	gac	ctt	ctt	cat	gac	192
	Thr	Phe	Leu	Asn	Val	Tyr	Ser	Val	Leu	Lys	Ser	Asp	Leu	Leu	His	Asp	
	50				55				60								
15	cct	tcc	ttc	gaa	ttc	acc	aat	gaa	tct	cgt	ctc	tgg	gtt	gat	cgg	atg	240
	Pro	Ser	Phe	Glu	Phe	Thr	Asn	Glu	Ser	Arg	Leu	Trp	Val	Asp	Arg	Met	
	65				70				75				80				
20	ctg	gac	tac	aat	gta	cgt	gga	ggg	aaa	ctc	aat	cgg	ggg	ctc	tct	gtt	288
	Leu	Asp	Tyr	Asn	Val	Arg	Gly	Gly	Lys	Leu	Asn	Arg	Gly	Leu	Ser	Val	
	85				90				95								
25	gtt	gac	agt	ttc	aaa	ctt	ttg	aag	caa	ggc	aat	gat	ttg	act	gag	caa	336
	Val	Asp	Ser	Phe	Lys	Leu	Leu	Lys	Gln	Gly	Asn	Asp	Leu	Thr	Glu	Gln	
	100				105				110								
30	gag	gtt	ttc	ctc	tct	tgt	gct	ctc	ggg	tgg	tgc	att	gaa	tgg	ctc	caa	384
	Glu	Val	Phe	Leu	Ser	Cys	Ala	Leu	Gly	Trp	Cys	Ile	Glu	Trp	Leu	Gln	
	115				120				125								
35	gct	tat	ttc	ctt	gtg	ctt	gat	gat	att	atg	gat	aac	tct	gtc	act	cgc	432
	Ala	Tyr	Phe	Leu	Val	Leu	Asp	Asp	Ile	Met	Asp	Asn	Ser	Val	Thr	Arg	
	130				135				140								
40	cgt	ggg	caa	cct	tgc	tgg	ttc	aga	gtt	cct	cag	gtt	ggg	atg	gtt	gcc	480
	Arg	Gly	Gln	Pro	Cys	Trp	Phe	Arg	Val	Pro	Gln	Val	Gly	Met	Val	Ala	
	145				150				155				160				
45	atc	aat	gat	ggg	att	cta	ctt	cgc	aat	cac	atc	cac	agg	att	ctc	aaa	528
	Ile	Asn	Asp	Gly	Ile	Leu	Leu	Arg	Asn	His	Ile	His	Arg	Ile	Leu	Lys	
	165				170				175								
50	aag	cat	ttc	cgt	gat	aag	cct	tac	tat	gtt	gac	ctt	gtt	gat	ttg	ttt	576
	Lys	His	Phe	Arg	Asp	Lys	Pro	Tyr	Tyr	Val	Asp	Leu	Val	Asp	Leu	Phe	
	180				185				190								
55	aat	gag	gtt	gag	ttg	caa	aca	gct	tgt	ggc	cag	atg	ata	gat	ttg	atc	624
	Asn	Glu	Val	Glu	Leu	Gln	Thr	Ala	Cys	Gly	Gln	Met	Ile	Asp	Leu	Ile	
	195				200				205								
60	acc	acc	ttt	gaa	gga	gaa	aag	gat	ttg	gcc	aag	tac	tca	ttg	tca	atc	672
	Thr	Thr	Phe	Glu	Gly	Glu	Lys	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ile	
	210				215				220								

## 165

	cac cgt cgt att gtc cag tac aaa acg gct tat tac tca ttt tat ctc	720
	His Arg Arg Ile Val Gln Tyr Lys Thr Ala Tyr Tyr Ser Phe Tyr Leu	
	225 230 235 240	
5	cct gtt gct tgt gcg ttg ctt atg gcg ggc gaa aat ttg gaa aac cat	768
	Pro Val Ala Cys Ala Leu Leu Met Ala Gly Glu Asn Leu Glu Asn His	
	245 250 255	
10	att gac gtg aaa aat gtt ctt gtt gac atg gga atc tac ttc caa gtg	816
	Ile Asp Val Lys Asn Val Leu Val Asp Met Gly Ile Tyr Phe Gln Val	
	260 265 270	
15	cag gat gat tat ctg gat tgt ttt gct gat ccc gag acg ctt ggc aag	864
	Gln Asp Asp Tyr Leu Asp Cys Phe Ala Asp Pro Glu Thr Leu Gly Lys	
	275 280 285	
20	ata gga aca gat ata gaa gat ttc aaa tgc tcg tgg ttg gtg gtt aag	912
	Ile Gly Thr Asp Ile Glu Asp Phe Lys Cys Ser Trp Leu Val Val Lys	
	290 295 300	
25	gca tta gag cgc tgc agc gaa gaa caa act aag ata tta tat gag aac	960
	Ala Leu Glu Arg Cys Ser Glu Glu Gln Thr Lys Ile Leu Tyr Glu Asn	
	305 310 315 320	
	tat ggt aaa ccc gac cca tcg aac gtt gct aaa gtg aag gat ctc tac	1008
	Tyr Gly Lys Pro Asp Pro Ser Asn Val Ala Lys Val Lys Asp Leu Tyr	
	325 330 335	
30	aaa gag ctg gat ctt gag gga gtt ttc atg gag tat gag agc aaa agc	1056
	Lys Glu Leu Asp Leu Glu Gly Val Phe Met Glu Tyr Glu Ser Lys Ser	
	340 345 350	
35	tac gag aag ctg act gga gcg att gag gga cac caa agt aaa gca atc	1104
	Tyr Glu Lys Leu Thr Gly Ala Ile Glu Gly His Gln Ser Lys Ala Ile	
	355 360 365	
40	caa gca gtg cta aaa tcc ttc ttg gct aag atc tac aag agg cag aag	1152
	Gln Ala Val Leu Lys Ser Phe Leu Ala Lys Ile Tyr Lys Arg Gln Lys	
	370 375 380	
	tag	1155
45	<210> 112	
	<211> 384	
	<212> PRT	
50		



166

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

5 &lt;400&gt; 112

Met Ser Val Ser Cys Cys Cys Arg Asn Leu Gly Lys Thr Ile Lys Lys  
 1 5 10 15

10

Ala Ile Pro Ser His His Leu His Leu Arg Ser Leu Gly Gly Ser Leu  
 20 25 30

15

Tyr Arg Arg Arg Ile Gln Ser Ser Ser Met Glu Thr Asp Leu Lys Ser  
 35 40 45

20

Thr Phe Leu Asn Val Tyr Ser Val Leu Lys Ser Asp Leu Leu His Asp  
 50 55 60

25

Pro Ser Phe Glu Phe Thr Asn Glu Ser Arg Leu Trp Val Asp Arg Met  
 65 70 75 80

Leu Asp Tyr Asn Val Arg Gly Gly Lys Leu Asn Arg Gly Leu Ser Val  
 85 90 95

30

Val Asp Ser Phe Lys Leu Leu Lys Gln Gly Asn Asp Leu Thr Glu Gln  
 100 105 110

35

Glu Val Phe Leu Ser Cys Ala Leu Gly Trp Cys Ile Glu Trp Leu Gln  
 115 120 125

40

Ala Tyr Phe Leu Val Leu Asp Asp Ile Met Asp Asn Ser Val Thr Arg  
 130 135 140

45

Arg Gly Gln Pro Cys Trp Phe Arg Val Pro Gln Val Gly Met Val Ala  
 145 150 155 160

Ile Asn Asp Gly Ile Leu Leu Arg Asn His Ile His Arg Ile Leu Lys  
 165 170 175

50

## 167

Lys His Phe Arg Asp Lys Pro Tyr Tyr Val Asp Leu Val Asp Leu Phe  
 180 185 190

5 Asn Glu Val Glu Leu Gln Thr Ala Cys Gly Gln Met Ile Asp Leu Ile  
 195 200 205

10 Thr Thr Phe Glu Gly Glu Lys Asp Leu Ala Lys Tyr Ser Leu Ser Ile  
 210 215 220

15 His Arg Arg Ile Val Gln Tyr Lys Thr Ala Tyr Tyr Ser Phe Tyr Leu  
 225 230 235 240

Pro Val Ala Cys Ala Leu Leu Met Ala Gly Glu Asn Leu Glu Asn His  
 245 250 255

20 Ile Asp Val Lys Asn Val Leu Val Asp Met Gly Ile Tyr Phe Gln Val  
 260 265 270

25 Gln Asp Asp Tyr Leu Asp Cys Phe Ala Asp Pro Glu Thr Leu Gly Lys  
 275 280 285

30 Ile Gly Thr Asp Ile Glu Asp Phe Lys Cys Ser Trp Leu Val Val Lys  
 290 295 300

35 Ala Leu Glu Arg Cys Ser Glu Glu Gln Thr Lys Ile Leu Tyr Glu Asn  
 305 310 315 320

Tyr Gly Lys Pro Asp Pro Ser Asn Val Ala Lys Val Lys Asp Leu Tyr  
 325 330 335

40 Lys Glu Leu Asp Leu Glu Gly Val Phe Met Glu Tyr Glu Ser Lys Ser  
 340 345 350

45 Tyr Glu Lys Leu Thr Gly Ala Ile Glu Gly His Gln Ser Lys Ala Ile  
 355 360 365

50 Gln Ala Val Leu Lys Ser Phe Leu Ala Lys Ile Tyr Lys Arg Gln Lys  
 370 375 380

<210> 113  
 5 <211> 1101  
 <212> DNA  
 <213> Sinabs alba  
 10  
 <220>  
 15 <221> CDS  
 <222> (1)..(1101)  
 <223>  
 20  
 <400> 113  
 25 atg gct tct tca gtg act cct cta ggt tca tgg gtt ctt ctt cac cat 48  
 Met Ala Ser Ser Val Thr Pro Leu Gly Ser Trp Val Leu Leu His His  
 1 5 10 15  
 cat cct tca act atc tta acc caa tcc aga tcc aga tct cct cct tct 96  
 His Pro Ser Thr Ile Leu Thr Gln Ser Arg Ser Arg Ser Pro Pro Ser  
 30 20 25 30  
 ctc atc acc ctt aaa ccc atc tcc ctc act cca aaa cgc acc gtt tcg 144  
 Leu Ile Thr Leu Lys Pro Ile Ser Leu Thr Pro Lys Arg Thr Val Ser  
 35 35 40 45  
 tct tct tcc tcc tct tcc ctc atc acc aaa gaa gac aac aac ctc aaa 192  
 Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Ile Thr Lys Glu Asp Asn Asn Leu Lys  
 50 55 60  
 40 tcc tct tcc tct tcc ttc gat ttc atg tct tac atc atc cgc aaa gcc 240  
 Ser Ser Ser Ser Ser Phe Asp Phe Met Ser Tyr Ile Ile Arg Lys Ala  
 65 70 75 80  
 gac tcc gtc aac aaa gcc tta gac tcc gcc gtc cct ctc cgg gag cca 288  
 45 Asp Ser Val Asn Lys Ala Leu Asp Ser Ala Val Pro Leu Arg Glu Pro  
 85 90 95  
 ctc aag atc cac gaa gcg atg cgt tac tct ctc ctc gcc gga gga aaa 336  
 Leu Lys Ile His Glu Ala Met Arg Tyr Ser Leu Leu Ala Gly Gly Lys  
 50 100 105 110

## 169

	cgc gtc aga cca gtt ctc tgc atc gcc gcg tgc gag cta gtc gga gga	384
	Arg Val Arg Pro Val Leu Cys Ile Ala Ala Cys Glu Leu Val Gly Gly	
	115 120 125	
5		
	gaa gag tct tta gct atg ccg gcg cgt tgc gcc gtg gaa atg atc cac	432
	Glu Glu Ser Leu Ala Met Pro Ala Arg Cys Ala Val Glu Met Ile His	
	130 135 140	
10		
	acc atg tcg ttg atc cac gac gac ttg cct tgt atg gat aac gac gat	480
	Thr Met Ser Leu Ile His Asp Asp Leu Pro Cys Met Asp Asn Asp Asp	
	145 150 155 160	
15		
	ctc cgc cgc gga aag ccc acg aat cac aaa gtt tac ggc gaa gac gtg	528
	Leu Arg Arg Gly Lys Pro Thr Asn His Lys Val Tyr Gly Glu Asp Val	
	165 170 175	
20		
	gcg gtt tta gcc gga gac gcg ctt ctt tcg ttc gcc ttc gag cat tta	576
	Ala Val Leu Ala Gly Asp Ala Leu Leu Ser Phe Ala Phe Glu His Leu	
	180 185 190	
25		
	gcg tcg gct acg agc tcg gag gtt tct ccg gcg aga gtg gtt aga gct	624
	Ala Ser Ala Thr Ser Ser Glu Val Ser Pro Ala Arg Val Val Arg Ala	
	195 200 205	
30		
	gtg gga gag ttg gct aaa gcc atc ggc acc gaa ggg ctc gtg gcg gga	672
	Val Gly Glu Leu Ala Lys Ala Ile Gly Thr Glu Gly Leu Val Ala Gly	
	210 215 220	
35		
	caa gtg gtg gat ata agc agt gaa ggg ttg gac tta aac aac gtc gga	720
	Gln Val Val Asp Ile Ser Ser Glu Gly Leu Asp Leu Asn Asn Val Gly	
	225 230 235 240	
40		
	ttg gag cat ttg aag ttt ata cat ttg cat aaa acg gcg gcg ttg ctt	768
	Leu Glu His Leu Lys Phe Ile His Leu His Lys Thr Ala Ala Leu Leu	
	245 250 255	
45		
	gaa gct tca gcg gtt ttg ggt ggg atc atc ggt gga ggg agt gat gaa	816
	Glu Ala Ser Ala Val Leu Gly Gly Ile Ile Gly Gly Gly Ser Asp Glu	
	260 265 270	
50		
	gag atc gag agg ctg agg aag ttc gcg agg tgt att ggg ttg ttg ttt	864
	Glu Ile Glu Arg Leu Arg Lys Phe Ala Arg Cys Ile Gly Leu Leu Phe	
	275 280 285	
55		
	cag gtg gtt gat gat atc ttg gac gtg acg aaa tcg tct caa gaa ctg	912
	Gln Val Val Asp Asp Ile Leu Asp Val Thr Lys Ser Ser Gln Glu Leu	
	290 295 300	
60		
	ggg aaa acc gct ggg aaa gat ttg att gct gat aag ttg act tat ccg	960

## 170

	Gly	Lys	Thr	Ala	Gly	Lys	Asp	Leu	Ile	Ala	Asp	Lys	Leu	Thr	Tyr	Pro	
	305					310				315						320	
5	aag	ctc	atg	ggt	ttg	gag	aaa	tcg	aga	gag	ttc	gct	gag	aag	ttg	aat	1008
	Lys	Leu	Met	Gly	Leu	Glu	Lys	Ser	Arg	Glu	Phe	Ala	Glu	Lys	Leu	Asn	
				325						330					335		
10	aca	gag	gca	cgt	gat	cag	ctt	tta	ggg	ttt	gat	tcc	gac	aag	gtt	gct	1056
	Thr	Glu	Ala	Arg	Asp	Gln	Leu	Leu	Gly	Phe	Asp	Ser	Asp	Lys	Val	Ala	
				340					345					350			
15	cct	ttg	ttg	gct	ttg	gct	aat	tac	att	gcc	aat	aga	cag	aac	tga		1101
	Pro	Leu	Leu	Ala	Leu	Ala	Asn	Tyr	Ile	Ala	Asn	Arg	Gln	Asn			
			355					360					365				
20	<210>	114															
	<211>	366															
	<212>	PRT															
	<213>	Sinabs alba															
25	<400>	114															
30	Met	Ala	Ser	Ser	Val	Thr	Pro	Leu	Gly	Ser	Trp	Val	Leu	Leu	His	His	
	1			5						10					15		
35	His	Pro	Ser	Thr	Ile	Leu	Thr	Gln	Ser	Arg	Ser	Arg	Ser	Pro	Pro	Ser	
			20					25						30			
40	Leu	Ile	Thr	Leu	Lys	Pro	Ile	Ser	Leu	Thr	Pro	Lys	Arg	Thr	Val	Ser	
		35					40						45				
	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Leu	Ile	Thr	Lys	Glu	Asp	Asn	Asn	Leu	Lys	
	50						55					60					
45	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Phe	Asp	Phe	Met	Ser	Tyr	Ile	Ile	Arg	Lys	Ala	
	65					70					75				80		
50	Asp	Ser	Val	Asn	Lys	Ala	Leu	Asp	Ser	Ala	Val	Pro	Leu	Arg	Glu	Pro	
				85						90					95		

171

Leu Lys Ile His Glu Ala Met Arg Tyr Ser Leu Leu Ala Gly Gly Lys  
100 105 110  
5

Arg Val Arg Pro Val Leu Cys Ile Ala Ala Cys Glu Leu Val Gly Gly  
115 120 125

10

Glu Glu Ser Leu Ala Met Pro Ala Arg Cys Ala Val Glu Met Ile His  
130 135 140

15

Thr Met Ser Leu Ile His Asp Asp Leu Pro Cys Met Asp Asn Asp Asp  
145 150 155 160

20

Leu Arg Arg Gly Lys Pro Thr Asn His Lys Val Tyr Gly Glu Asp Val  
165 170 175

25

Ala Val Leu Ala Gly Asp Ala Leu Leu Ser Phe Ala Phe Glu His Leu  
180 185 190

30

Ala Ser Ala Thr Ser Ser Glu Val Ser Pro Ala Arg Val Val Arg Ala  
195 200 205

35

Val Gly Glu Leu Ala Lys Ala Ile Gly Thr Glu Gly Leu Val Ala Gly  
210 215 220

40

Gln Val Val Asp Ile Ser Ser Glu Gly Leu Asp Leu Asn Asn Val Gly  
225 230 235 240

45

Leu Glu His Leu Lys Phe Ile His Leu His Lys Thr Ala Ala Leu Leu  
245 250 255

50

Glu Ala Ser Ala Val Leu Gly Gly Ile Ile Gly Gly Gly Ser Asp Glu  
260 265 270

Glu Ile Glu Arg Leu Arg Lys Phe Ala Arg Cys Ile Gly Leu Leu Phe  
275 280 285

## 172

Gln Val Val Asp Asp Ile Leu Asp Val Thr Lys Ser Ser Gln Glu Leu  
 290 295 300

5 Gly Lys Thr Ala Gly Lys Asp Leu Ile Ala Asp Lys Leu Thr Tyr Pro  
 305 310 315 320

10 Lys Leu Met Gly Leu Glu Lys Ser Arg Glu Phe Ala Glu Lys Leu Asn  
 325 330 335

15 Thr Glu Ala Arg Asp Gln Leu Leu Gly Phe Asp Ser Asp Lys Val Ala  
 340 345 350

20 Pro Leu Leu Ala Leu Ala Asn Tyr Ile Ala Asn Arg Gln Asn  
 355 360 365

<210> 115

<211> 930

25 <212> DNA

<213> Erwinia uredovora

30 <220>

<221> CDS

35 <222> (1)..(930)

<223>

40 <400> 115

atg aat aat ccg tcg tta ctc aat cat gcg gtc gaa acg atg gca gtt 48  
 Met Asn Asn Pro Ser Leu Leu Asn His Ala Val Glu Thr Met Ala Val  
 1 5 10 15

45 ggc tcg aaa agt ttt gcg aca gcc tca aag tta ttt gat gca aaa acc 96  
 Gly Ser Lys Ser Phe Ala Thr Ala Ser Lys Leu Phe Asp Ala Lys Thr  
 20 25 30

50 cgg cgc agc gta ctg atg ctc tac gcc tgg tgc cgc cat tgt gac gat 144

## 173

	Arg	Arg	Ser	Val	Leu	Met	Leu	Tyr	Ala	Trp	Cys	Arg	His	Cys	Asp	Asp	
			35					40					45				
5	gtt	att	gac	gat	cag	acg	ctg	ggc	ttt	cag	gcc	cgg	cag	cct	gcc	tta	192
	Val	Ile	Asp	Asp	Gln	Thr	Leu	Gly	Phe	Gln	Ala	Arg	Gln	Pro	Ala	Leu	
		50					55				60						
10	caa	acg	ccc	gaa	caa	cgt	ctg	atg	caa	ctt	gag	atg	aaa	acg	cgc	cag	240
	Gln	Thr	Pro	Glu	Gln	Arg	Leu	Met	Gln	Leu	Glu	Met	Lys	Thr	Arg	Gln	
	65					70				75					80		
15	gcc	tat	gca	gga	tcg	cag	atg	cac	gaa	ccg	gcg	ttt	gcg	gct	ttt	cag	288
	Ala	Tyr	Ala	Gly	Ser	Gln	Met	His	Glu	Pro	Ala	Phe	Ala	Ala	Phe	Gln	
					85					90					95		
	gaa	gtg	gct	atg	gct	cat	gat	atc	gcc	ccg	gct	tac	gcg	ttt	gat	cat	336
	Glu	Val	Ala	Met	Ala	His	Asp	Ile	Ala	Pro	Ala	Tyr	Ala	Phe	Asp	His	
				100					105					110			
20	ctg	gaa	ggc	ttc	gcc	atg	gat	gta	cgc	gaa	gcg	caa	tac	agc	caa	ctg	384
	Leu	Glu	Gly	Phe	Ala	Met	Asp	Val	Arg	Glu	Ala	Gln	Tyr	Ser	Gln	Leu	
			115					120					125				
25	gat	gat	acg	ctg	cgc	tat	tgc	tat	cac	gtt	gca	ggc	gtt	gtc	ggc	ttg	432
	Asp	Asp	Thr	Leu	Arg	Tyr	Cys	Tyr	His	Val	Ala	Gly	Val	Val	Gly	Leu	
		130					135					140					
30	atg	atg	gcg	caa	atc	atg	ggc	gtg	cgg	gat	aac	gcc	acg	ctg	gac	cgc	480
	Met	Met	Ala	Gln	Ile	Met	Gly	Val	Arg	Asp	Asn	Ala	Thr	Leu	Asp	Arg	
	145					150					155				160		
35	gcc	tgt	gac	ctt	ggg	ctg	gca	ttt	cag	ttg	acc	aat	att	gct	cgc	gat	528
	Ala	Cys	Asp	Leu	Gly	Leu	Ala	Phe	Gln	Leu	Thr	Asn	Ile	Ala	Arg	Asp	
				165						170					175		
	att	gtg	gac	gat	gcg	cat	gcg	ggc	cgc	tgt	tat	ctg	ccg	gca	agc	tgg	576
	Ile	Val	Asp	Asp	Ala	His	Ala	Gly	Arg	Cys	Tyr	Leu	Pro	Ala	Ser	Trp	
				180					185					190			
40	ctg	gag	cat	gaa	ggc	ctg	aac	aaa	gag	aat	tat	gcg	gca	cct	gaa	aac	624
	Leu	Glu	His	Glu	Gly	Leu	Asn	Lys	Glu	Asn	Tyr	Ala	Ala	Pro	Glu	Asn	
				195				200					205				
45	cgt	cag	gcg	ctg	agc	cgt	atc	gcc	cgt	cgt	ttg	gtg	cag	gaa	gca	gaa	672
	Arg	Gln	Ala	Leu	Ser	Arg	Ile	Ala	Arg	Arg	Leu	Val	Gln	Glu	Ala	Glu	
		210					215					220					
50	cct	tac	tat	ttg	tct	gcc	aca	gcc	ggc	ctg	gca	ggg	ttg	ccc	ctg	cgt	720
	Pro	Tyr	Tyr	Leu	Ser	Ala	Thr	Ala	Gly	Leu	Ala	Gly	Leu	Pro	Leu	Arg	
	225					230					235				240		



## 174

tcc gcc tgg gca atc gct acg gcg aag cag gtt tac cgg aaa ata ggt 768  
 Ser Ala Trp Ala Ile Ala Thr Ala Lys Gln Val Tyr Arg Lys Ile Gly  
 245 250 255  
 5  
 gtc aaa gtt gaa cag gcc ggt cag caa gcc tgg gat cag cgg cag tca 816  
 Val Lys Val Glu Gln Ala Gly Gln Gln Ala Trp Asp Gln Arg Gln Ser  
 260 265 270  
 10  
 acg acc acg ccc gaa aaa tta acg ctg ctg ctg gcc gcc tct ggt cag 864  
 Thr Thr Thr Pro Glu Lys Leu Thr Leu Leu Leu Ala Ala Ser Gly Gln  
 275 280 285  
 15  
 gcc ctt act tcc cgg atg cgg gct cat cct ccc cgc cct gcg cat ctc 912  
 Ala Leu Thr Ser Arg Met Arg Ala His Pro Pro Arg Pro Ala His Leu  
 290 295 300  
 20  
 tgg cag cgc ccg ctc tag 930  
 Trp Gln Arg Pro Leu  
 305  
 <210> 116  
 25  
 <211> 309  
 <212> PRT  
 <213> Erwinia uredovora  
 30  
 <400> 116  
 35  
 Met Asn Asn Pro Ser Leu Leu Asn His Ala Val Glu Thr Met Ala Val  
 1 5 10 15  
 40  
 Gly Ser Lys Ser Phe Ala Thr Ala Ser Lys Leu Phe Asp Ala Lys Thr  
 20 25 30  
 45  
 Arg Arg Ser Val Leu Met Leu Tyr Ala Trp Cys Arg His Cys Asp Asp  
 35 40 45  
 50  
 Val Ile Asp Asp Gln Thr Leu Gly Phe Gln Ala Arg Gln Pro Ala Leu  
 50 55 60  
 50

## 175

Gln Thr Pro Glu Gln Arg Leu Met Gln Leu Glu Met Lys Thr Arg Gln  
 65 70 75 80

5 Ala Tyr Ala Gly Ser Gln Met His Glu Pro Ala Phe Ala Ala Phe Gln  
 85 90 95

10 Glu Val Ala Met Ala His Asp Ile Ala Pro Ala Tyr Ala Phe Asp His  
 100 105 110

15 Leu Glu Gly Phe Ala Met Asp Val Arg Glu Ala Gln Tyr Ser Gln Leu  
 115 120 125

Asp Asp Thr Leu Arg Tyr Cys Tyr His Val Ala Gly Val Val Gly Leu  
 130 135 140

20 Met Met Ala Gln Ile Met Gly Val Arg Asp Asn Ala Thr Leu Asp Arg  
 145 150 155 160

25 Ala Cys Asp Leu Gly Leu Ala Phe Gln Leu Thr Asn Ile Ala Arg Asp  
 165 170 175

30 Ile Val Asp Asp Ala His Ala Gly Arg Cys Tyr Leu Pro Ala Ser Trp  
 180 185 190

35 Leu Glu His Glu Gly Leu Asn Lys Glu Asn Tyr Ala Ala Pro Glu Asn  
 195 200 205

Arg Gln Ala Leu Ser Arg Ile Ala Arg Arg Leu Val Gln Glu Ala Glu  
 210 215 220

40 Pro Tyr Tyr Leu Ser Ala Thr Ala Gly Leu Ala Gly Leu Pro Leu Arg  
 225 230 235 240

45 Ser Ala Trp Ala Ile Ala Thr Ala Lys Gln Val Tyr Arg Lys Ile Gly  
 245 250 255

50 Val Lys Val Glu Gln Ala Gly Gln Gln Ala Trp Asp Gln Arg Gln Ser  
 260 265 270

Thr Thr Thr Pro Glu Lys Leu Thr Leu Leu Leu Ala Ala Ser Gly Gln  
 275 280 285  
 5

Ala Leu Thr Ser Arg Met Arg Ala His Pro Pro Arg Pro Ala His Leu  
 290 295 300  
 10

Trp Gln Arg Pro Leu  
 305

15 <210> 117  
 <211> 1479  
 <212> DNA  
 20 <213> Erwinia uredovora

25 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1) .. (1479)  
 30 <223>

35 <400> 117  
 atg aaa cca act acg gta att ggt gca ggc ttc ggt ggc ctg gca ctg 48  
 Met Lys Pro Thr Thr Val Ile Gly Ala Gly Phe Gly Gly Leu Ala Leu  
 1 5 10 15

40 gca att cgt cta caa gct gcg ggg atc ccc gtc tta ctg ctt gaa caa 96  
 Ala Ile Arg Leu Gln Ala Ala Gly Ile Pro Val Leu Leu Leu Glu Gln  
 20 25 30

45 cgt gat aaa ccc ggc ggt cgg gct tat gtc tac gag gat cag ggg ttt 144  
 Arg Asp Lys Pro Gly Gly Arg Ala Tyr Val Tyr Glu Asp Gln Gly Phe  
 35 40 45

acc ttt gat gca ggc ccg acg gtt atc acc gat ccc agt gcc att gaa 192  
 Thr Phe Asp Ala Gly Pro Thr Val Ile Thr Asp Pro Ser Ala Ile Glu  
 50 55 60

	gaa ctg ttt gca ctg gca gga aaa cag tta aaa gag tat gtc gaa ctg	240
	Glu Leu Phe Ala Leu Ala Gly Lys Gln Leu Lys Glu Tyr Val Glu Leu	
	65 70 75 80	
5	ctg ccg gtt acg ccg ttt tac cgc ctg tgt tgg gag tca ggg aag gtc	288
	Leu Pro Val Thr Pro Phe Tyr Arg Leu Cys Trp Glu Ser Gly Lys Val	
	85 90 95	
10	ttt aat tac gat aac gat caa acc cgg ctc gaa gcg cag att cag cag	336
	Phe Asn Tyr Asp Asn Asp Gln Thr Arg Leu Glu Ala Gln Ile Gln Gln	
	100 105 110	
15	ttt aat ccc cgc gat gtc gaa ggt tat cgt cag ttt ctg gac tat tca	384
	Phe Asn Pro Arg Asp Val Glu Gly Tyr Arg Gln Phe Leu Asp Tyr Ser	
	115 120 125	
20	cgc gcg gtg ttt aaa gaa ggc tat cta aag ctc ggt act gtc cct ttt	432
	Arg Ala Val Phe Lys Glu Gly Tyr Leu Lys Leu Gly Thr Val Pro Phe	
	130 135 140	
25	tta tcg ttc aga gac atg ctt cgc gcc gca cct caa ctg gcg aaa ctg	480
	Leu Ser Phe Arg Asp Met Leu Arg Ala Ala Pro Gln Leu Ala Lys Leu	
	145 150 155 160	
	cag gca tgg aga agc gtt tac agt aag gtt gcc agt tac atc gaa gat	528
	Gln Ala Trp Arg Ser Val Tyr Ser Lys Val Ala Ser Tyr Ile Glu Asp	
	165 170 175	
30	gaa cat ctg cgc cag gcg ttt tct ttc cac tcg ctg ttg gtg ggc ggc	576
	Glu His Leu Arg Gln Ala Phe Ser Phe His Ser Leu Leu Val Gly Gly	
	180 185 190	
35	aat ccc ttc gcc acc tca tcc att tat acg ttg ata cac gcg ctg gag	624
	Asn Pro Phe Ala Thr Ser Ser Ile Tyr Thr Leu Ile His Ala Leu Glu	
	195 200 205	
40	cgt gag tgg ggc gtc tgg ttt ccg cgt ggc ggc acc ggc gca tta gtt	672
	Arg Glu Trp Gly Val Trp Phe Pro Arg Gly Gly Thr Gly Ala Leu Val	
	210 215 220	
45	cag ggg atg ata aag ctg ttt cag gat ctg ggt ggc gaa gtc gtg tta	720
	Gln Gly Met Ile Lys Leu Phe Gln Asp Leu Gly Gly Glu Val Val Leu	
	225 230 235 240	
	aac gcc aga gtc agc cat atg gaa acg aca gga aac aag att gaa gcc	768
	Asn Ala Arg Val Ser His Met Glu Thr Thr Gly Asn Lys Ile Glu Ala	
	245 250 255	
50	gtg cat tta gag gac ggt cgc agg ttc ctg acg caa gcc gtc gcg tca	816

## 178

	Val His Leu Glu Asp Gly Arg Arg Phe Leu Thr Gln Ala Val Ala Ser	
	260 265 270	
5	aat gca gat gtg gtt cat acc tat cgc gac ctg tta agc cag cac cct Asn Ala Asp Val Val His Thr Tyr Arg Asp Leu Leu Ser Gln His Pro	864
	275 280 285	
10	gcc gcg gtt aag cag tcc aac aaa ctg cag act aag cgc atg agt aac Ala Ala Val Lys Gln Ser Asn Lys Leu Gln Thr Lys Arg Met Ser Asn	912
	290 295 300	
15	tct ctg ttt gtg ctc tat ttt ggt ttg aat cac cat cat gat cag ctc Ser Leu Phe Val Leu Tyr Phe Gly Leu Asn His His His Asp Gln Leu	960
	305 310 315 320	
	gcg cat cac acg gtt tgt ttc ggc ccg cgt tac cgc gag ctg att gac Ala His His Thr Val Cys Phe Gly Pro Arg Tyr Arg Glu Leu Ile Asp	1008
	325 330 335	
20	gaa att ttt aat cat gat ggc ctc gca gag gac ttc tca ctt tat ctg Glu Ile Phe Asn His Asp Gly Leu Ala Glu Asp Phe Ser Leu Tyr Leu	1056
	340 345 350	
25	cac gcg ccc tgt gtc acg gat tcg tca ctg gcg cct gaa ggt tgc ggc His Ala Pro Cys Val Thr Asp Ser Ser Leu Ala Pro Glu Gly Cys Gly	1104
	355 360 365	
30	agt tac tat gtg ttg gcg ccg gtg ccg cat tta ggc acc gcg aac ctc Ser Tyr Tyr Val Leu Ala Pro Val Pro His Leu Gly Thr Ala Asn Leu	1152
	370 375 380	
35	gac tgg acg gtt gag ggg cca aaa cta cgc gac cgt att ttt gcg tac Asp Trp Thr Val Glu Gly Pro Lys Leu Arg Asp Arg Ile Phe Ala Tyr	1200
	385 390 395 400	
	ctt gag cag cat tac atg cct ggc tta cgg agt cag ctg gtc acg cac Leu Glu Gln His Tyr Met Pro Gly Leu Arg Ser Gln Leu Val Thr His	1248
	405 410 415	
40	cgg atg ttt acg ccg ttt gat ttt cgc gac cag ctt aat gcc tat cat Arg Met Phe Thr Pro Phe Asp Phe Arg Asp Gln Leu Asn Ala Tyr His	1296
	420 425 430	
45	ggc tca gcc ttt tct gtg gag ccc gtt ctt acc cag agc gcc tgg ttt Gly Ser Ala Phe Ser Val Glu Gly Pro Val Leu Thr Gln Ser Ala Trp Phe	1344
	435 440 445	
50	cgg ccg cat aac cgc gat aaa acc att act aat ctc tac ctg gtc ggc Arg Pro His Asn Arg Asp Lys Thr Ile Thr Asn Leu Tyr Leu Val Gly	1392
	450 455 460	

## 179

gca ggc acg cat ccc ggc gca ggc att cct ggc gtc atc ggc tcg gca 1440  
 Ala Gly Thr His Pro Gly Ala Gly Ile Pro Gly Val Ile Gly Ser Ala  
 465 470 475 480  
 5  
 aaa gcg aca gca ggt ttg atg ctg gag gat ctg ata tga 1479  
 Lys Ala Thr Ala Gly Leu Met Leu Glu Asp Leu Ile  
 485 490  
 10  
 <210> 118  
 <211> 492  
 15  
 <212> PRT  
 <213> Erwinia uredovora  
 20  
 <400> 118  
 Met Lys Pro Thr Thr Val Ile Gly Ala Gly Phe Gly Gly Leu Ala Leu  
 1 5 10 15  
 25  
 Ala Ile Arg Leu Gln Ala Ala Gly Ile Pro Val Leu Leu Leu Glu Gln  
 20 25 30  
 30  
 Arg Asp Lys Pro Gly Gly Arg Ala Tyr Val Tyr Glu Asp Gln Gly Phe  
 35 40 45  
 35  
 Thr Phe Asp Ala Gly Pro Thr Val Ile Thr Asp Pro Ser Ala Ile Glu  
 50 55 60  
 40  
 Glu Leu Phe Ala Leu Ala Gly Lys Gln Leu Lys Glu Tyr Val Glu Leu  
 65 70 75 80  
 45  
 Leu Pro Val Thr Pro Phe Tyr Arg Leu Cys Trp Glu Ser Gly Lys Val  
 85 90 95  
 50  
 Phe Asn Tyr Asp Asn Asp Gln Thr Arg Leu Glu Ala Gln Ile Gln Gln  
 100 105 110

	Phe	Asn	Pro	Arg	Asp	Val	Glu	Gly	Tyr	Arg	Gln	Phe	Leu	Asp	Tyr	Ser
	115							120					125			
5	Arg	Ala	Val	Phe	Lys	Glu	Gly	Tyr	Leu	Lys	Leu	Gly	Thr	Val	Pro	Phe
	130						135					140				
10	Leu	Ser	Phe	Arg	Asp	Met	Leu	Arg	Ala	Ala	Pro	Gln	Leu	Ala	Lys	Leu
	145					150					155					160
15	Gln	Ala	Trp	Arg	Ser	Val	Tyr	Ser	Lys	Val	Ala	Ser	Tyr	Ile	Glu	Asp
					165					170					175	
20	Glu	His	Leu	Arg	Gln	Ala	Phe	Ser	Phe	His	Ser	Leu	Leu	Val	Gly	Gly
				180					185					190		
25	Asn	Pro	Phe	Ala	Thr	Ser	Ser	Ile	Tyr	Thr	Leu	Ile	His	Ala	Leu	Glu
			195					200					205			
30	Arg	Glu	Trp	Gly	Val	Trp	Phe	Pro	Arg	Gly	Gly	Thr	Gly	Ala	Leu	Val
	210						215					220				
35	Gln	Gly	Met	Ile	Lys	Leu	Phe	Gln	Asp	Leu	Gly	Gly	Glu	Val	Val	Leu
	225					230					235					240
40	Asn	Ala	Arg	Val	Ser	His	Met	Glu	Thr	Thr	Gly	Asn	Lys	Ile	Glu	Ala
					245					250					255	
45	Val	His	Leu	Glu	Asp	Gly	Arg	Arg	Phe	Leu	Thr	Gln	Ala	Val	Ala	Ser
				260					265					270		
50	Asn	Ala	Asp	Val	Val	His	Thr	Tyr	Arg	Asp	Leu	Leu	Ser	Gln	His	Pro
		275						280					285			
55	Ala	Ala	Val	Lys	Gln	Ser	Asn	Lys	Leu	Gln	Thr	Lys	Arg	Met	Ser	Asn
	290						295					300				
60	Ser	Leu	Phe	Val	Leu	Tyr	Phe	Gly	Leu	Asn	His	His	His	Asp	Gln	Leu
	305					310					315					320

Ala His His Thr Val Cys Phe Gly Pro Arg Tyr Arg Glu Leu Ile Asp  
 325 330 335  
 5

Glu Ile Phe Asn His Asp Gly Leu Ala Glu Asp Phe Ser Leu Tyr Leu  
 340 345 350  
 10

His Ala Pro Cys Val Thr Asp Ser Ser Leu Ala Pro Glu Gly Cys Gly  
 355 360 365  
 15

Ser Tyr Tyr Val Leu Ala Pro Val Pro His Leu Gly Thr Ala Asn Leu  
 370 375 380  
 20

Asp Trp Thr Val Glu Gly Pro Lys Leu Arg Asp Arg Ile Phe Ala Tyr  
 385 390 395 400  
 25

Leu Glu Gln His Tyr Met Pro Gly Leu Arg Ser Gln Leu Val Thr His  
 405 410 415  
 30

Arg Met Phe Thr Pro Phe Asp Phe Arg Asp Gln Leu Asn Ala Tyr His  
 420 425 430  
 35

Gly Ser Ala Phe Ser Val Glu Pro Val Leu Thr Gln Ser Ala Trp Phe  
 435 440 445  
 40

Arg Pro His Asn Arg Asp Lys Thr Ile Thr Asn Leu Tyr Leu Val Gly  
 450 455 460  
 45

Ala Gly Thr His Pro Gly Ala Gly Ile Pro Gly Val Ile Gly Ser Ala  
 465 470 475 480  
 50

Lys Ala Thr Ala Gly Leu Met Leu Glu Asp Leu Ile  
 485 490  
 <210> 119  
 <211> 1725



<212> DNA

<213> Narcissus pseudonarcissus

5

**<220>**

<221> CDS

10

<222> (1) .. (1725)

<223>

15

<400> 119

atg gct tct tcc act tgt tta att cat tct tcc tct ttt ggg gtt gga      48  
Met Ala Ser Ser Thr Cys Leu Ile His Ser Ser Ser Phe Gly Val Gly

20                  1                        5                                  10    15

gga aag aaa gtg aag atg aac acg atg att cga tcg aag ttg ttt tca 96  
Gly Lys Lys Val Lys Met Asn Thr Met Ile Arg Ser Lys Leu Phe Ser  
20 25 30

25            att cgg tcg gct ttg gac act aag gtg tct gat atg agc gtc aat gct            144  
             Ile Arg Ser Ala Leu Asp Thr Lys Val Ser Asp Met Ser Val Asn Ala  
                    35                          40                          45

**30**    cca aaa gga ttg ttt cca cca gag cct gag cac tac agg ggg cca aag                 192  
Pro Lys Gly Leu Phe Pro Pro Glu Pro Glu His Tyr Arg Gly Pro Lys  
            50                          55                          60

**35**      ctt aaa gtg gct atc att gga gct ggg ctg gct gcc atg tca act gca                  240  
Leu Lys Val Ala Ile Ile Gly Ala Gly Leu Ala Gly Met Ser Thr Ala  
65                         70                         75                         80

gtg gag ctt ttg gat caa ggg cat gag gtt gac ata tat gaa tcc aga 288  
Val Glu Leu Leu Asp Gln Gly His Glu Val Asp Ile Tyr Glu Ser Arg  
40 85 90 95

caa ttt att ggt ggt aaa gtc ggt tct ttt gta gat aag cgt gga aac 336  
Gln Phe Ile Gly Gly Lys Val Gly Ser Phe Val Asp Lys Arg Gly Asn  
100 105 110

cat att gaa atg gga ctc cat gtg ttt ttt ggt tgc tat aac aat ctt 384  
His Ile Glu Met Gly Leu His Val Phe Phe Gly Cys Tyr Asn Asn Leu  
115 120 125

50    ttc aga ctt atg aaa aaq gta ggt gca gat gaa aat tta ctg gtg aag                      432

## 183

	Phe	Arg	Leu	Met	Lys	Lys	Val	Gly	Ala	Asp	Glu	Asn	Leu	Leu	Val	Lys	
	130						135					140					
5	gat	cat	act	cat	acc	ttt	gta	aac	cga	ggt	gga	gaa	att	ggt	gaa	ctt	480
	Asp	His	Thr	His	Thr	Phe	Val	Asn	Arg	Gly	Gly	Glu	Ile	Gly	Glu	Leu	
	145					150				155					160		
10	gat	ttc	cga	ctt	ccg	atg	ggt	gca	cca	tta	cat	ggt	att	cgt	gca	ttt	528
	Asp	Phe	Arg	Leu	Pro	Met	Gly	Ala	Pro	Leu	His	Gly	Ile	Arg	Ala	Phe	
					165				170						175		
15	cta	aca	act	aat	caa	ctg	aag	cct	tat	gat	aaa	gca	agg	aat	gct	gtg	576
	Leu	Thr	Thr	Asn	Gln	Leu	Lys	Pro	Tyr	Asp	Lys	Ala	Arg	Asn	Ala	Val	
				180					185					190			
	gct	ctt	gcc	ctt	agc	cca	gtt	gta	cgt	gct	ctt	att	gat	cca	aat	ggt	624
	Ala	Leu	Ala	Leu	Ser	Pro	Val	Val	Arg	Ala	Leu	Ile	Asp	Pro	Asn	Gly	
		195					200					205					
20	gca	atg	cag	gat	ata	agg	aac	tta	gat	aat	att	agc	ttt	tct	gat	tgg	672
	Ala	Met	Gln	Asp	Ile	Arg	Asn	Leu	Asp	Asn	Ile	Ser	Phe	Ser	Asp	Trp	
		210					215					220					
25	ttc	tta	tcc	aaa	ggc	ggt	acc	cgc	atg	agc	atc	caa	agg	atg	tgg	gat	720
	Phe	Leu	Ser	Lys	Gly	Gly	Thr	Arg	Met	Ser	Ile	Gln	Arg	Met	Trp	Asp	
	225					230					235				240		
30	cca	gtt	gct	tat	gcc	ctc	gga	ttt	att	gac	tgt	gat	aat	atc	agt	gcc	768
	Pro	Val	Ala	Tyr	Ala	Leu	Gly	Phe	Ile	Asp	Cys	Asp	Asn	Ile	Ser	Ala	
				245						250					255		
35	cgt	tgt	atg	ctt	act	ata	ttt	tct	cta	ttt	gct	act	aag	aca	gaa	gct	816
	Arg	Cys	Met	Leu	Thr	Ile	Phe	Ser	Leu	Phe	Ala	Thr	Lys	Thr	Glu	Ala	
				260					265					270			
	tct	ctg	ttg	cgt	atg	ttg	aag	ggt	tcg	cct	gat	gtt	tac	tta	agc	ggt	864
	Ser	Leu	Leu	Arg	Met	Leu	Lys	Gly	Ser	Pro	Asp	Val	Tyr	Leu	Ser	Gly	
		275						280					285				
40	cct	ata	aga	aag	tat	att	aca	gat	aaa	ggt	gga	agg	ttt	cac	cta	agg	912
	Pro	Ile	Arg	Lys	Tyr	Ile	Thr	Asp	Lys	Gly	Gly	Arg	Phe	His	Leu	Arg	
		290					295					300					
45	tgg	ggg	tgt	aga	gag	ata	ctt	tat	gat	gaa	cta	tca	aat	ggc	gac	aca	960
	Trp	Gly	Cys	Arg	Glu	Ile	Leu	Tyr	Asp	Glu	Leu	Ser	Asn	Gly	Asp	Thr	
	305					310					315				320		
50	tat	atc	aca	ggc	att	gca	atg	tcg	aag	gct	acc	aat	aaa	aaa	ctt	gtg	1008
	Tyr	Ile	Thr	Gly	Ile	Ala	Met	Ser	Lys	Ala	Thr	Asn	Lys	Lys	Leu	Val	
				325						330					335		

	aaa gct gac gtg tat gtt gca gca tgt gat gtt cct gga ata aaa agg	1056
	Lys Ala Asp Val Tyr Val Ala Ala Cys Asp Val Pro Gly Ile Lys Arg	
	340 345 350	
5	ttg atc cca tcg gag tgg aga gaa tgg gat cta ttt gac aat atc tat	1104
	Leu Ile Pro Ser Glu Trp Arg Glu Trp Asp Leu Phe Asp Asn Ile Tyr	
	355 360 365	
10	aaa cta gtt gga gtt cca gtt gtc act gtt cag ctt agg tac aat ggt	1152
	Lys Leu Val Gly Val Pro Val Val Thr Val Gln Leu Arg Tyr Asn Gly	
	370 375 380	
15	tgg gtg aca gag atg caa gat ctg gaa aaa tca agg cag ttg aga gct	1200
	Trp Val Thr Glu Met Gln Asp Leu Glu Lys Ser Arg Gln Leu Arg Ala	
	385 390 395 400	
20	gca gta gga ttg gat aat ctt ctt tat act cca gat gca gac ttt tct	1248
	Ala Val Gly Leu Asp Asn Leu Leu Tyr Thr Pro Asp Ala Asp Phe Ser	
	405 410 415	
25	tgt ttt tct gat ctt gca ctc tcg tcg cct gaa gat tat tat att gaa	1296
	Cys Phe Ser Asp Leu Ala Leu Ser Ser Pro Glu Asp Tyr Tyr Ile Glu	
	420 425 430	
	gga caa ggg tcc cta ata cag gct gtt ctc acg cca ggg gat cca tac	1344
	Gly Gln Gly Ser Leu Ile Gln Ala Val Leu Thr Pro Gly Asp Pro Tyr	
	435 440 445	
30	atg ccc cta cct aat gat gca att ata gaa aga gtt cgg aaa cag gtt	1392
	Met Pro Leu Pro Asn Asp Ala Ile Ile Glu Arg Val Arg Lys Gln Val	
	450 455 460	
35	ttg gat tta ttc cca tcc tct caa ggc ctg gaa gtt cta tgg tct tcg	1440
	Leu Asp Leu Phe Pro Ser Ser Gln Gly Leu Glu Val Leu Trp Ser Ser	
	465 470 475 480	
40	gtg gtt aaa atc gga caa tcc cta tat cgg gag ggg cct gga aag gac	1488
	Val Val Lys Ile Gly Gln Ser Leu Tyr Arg Glu Gly Pro Gly Lys Asp	
	485 490 495	
45	cca ttc aga cct gat cag aag aca cca gta aaa aat ttc ttc ctt gca	1536
	Pro Phe Arg Pro Asp Gln Lys Thr Pro Val Lys Asn Phe Phe Leu Ala	
	500 505 510	
	ggt tca tac acc aaa cag gat tac att gac agt atg gaa gga gcg acc	1584
	Gly Ser Tyr Thr Lys Gln Asp Tyr Ile Asp Ser Met Glu Gly Ala Thr	
	515 520 525	
50	cta tcg ggg aga caa gca gct gca tat atc tgc agc gcc ggt gaa gat	1632

## 185

Leu Ser Gly Arg Gln Ala Ala Ala Tyr Ile Cys Ser Ala Gly Glu Asp  
 530 535 540

5 ctg gca gca ctt cgc aag aag atc gct gct gat cat cca gag caa ctg 1680  
 Leu Ala Ala Leu Arg Lys Lys Ile Ala Ala Asp His Pro Glu Gln Leu  
 545 550 555 560

10 atc aac aaa gat tct aac gtg tcg gat gaa ctg agt ctc gta taa 1725  
 Ile Asn Lys Asp Ser Asn Val Ser Asp Glu Leu Ser Leu Val  
 565 570

<210> 120

15 <211> 574

<212> PRT

20 <213> Narcissus pseudonarcissus

<400> 120

25 Met Ala Ser Ser Thr Cys Leu Ile His Ser Ser Ser Phe Gly Val Gly  
 1 5 10 15

30 Gly Lys Lys Val Lys Met Asn Thr Met Ile Arg Ser Lys Leu Phe Ser  
 20 25 30

35 Ile Arg Ser Ala Leu Asp Thr Lys Val Ser Asp Met Ser Val Asn Ala  
 35 40 45

40 Pro Lys Gly Leu Phe Pro Pro Glu Pro Glu His Tyr Arg Gly Pro Lys  
 50 55 60

45 Leu Lys Val Ala Ile Ile Gly Ala Gly Leu Ala Gly Met Ser Thr Ala  
 65 70 75 80

50 Val Glu Leu Leu Asp Gln Gly His Glu Val Asp Ile Tyr Glu Ser Arg  
 85 90 95

Gln Phe Ile Gly Gly Lys Val Gly Ser Phe Val Asp Lys Arg Gly Asn  
 100 105 110

His Ile Glu Met Gly Leu His Val Phe Phe Gly Cys Tyr Asn Asn Leu  
115 120 125  
5

Phe Arg Leu Met Lys Lys Val Gly Ala Asp Glu Asn Leu Leu Val Lys  
130 135 140

10

Asp His Thr His Thr Phe Val Asn Arg Gly Gly Glu Ile Gly Glu Leu  
145 150 155 160

15

Asp Phe Arg Leu Pro Met Gly Ala Pro Leu His Gly Ile Arg Ala Phe  
165 170 175

20

Leu Thr Thr Asn Gln Leu Lys Pro Tyr Asp Lys Ala Arg Asn Ala Val  
180 185 190

25

Ala Leu Ala Leu Ser Pro Val Val Arg Ala Leu Ile Asp Pro Asn Gly  
195 200 205

30

Ala Met Gln Asp Ile Arg Asn Leu Asp Asn Ile Ser Phe Ser Asp Trp  
210 215 220

35

Phe Leu Ser Lys Gly Gly Thr Arg Met Ser Ile Gln Arg Met Trp Asp  
225 230 235 240

40

Pro Val Ala Tyr Ala Leu Gly Phe Ile Asp Cys Asp Asn Ile Ser Ala  
245 250 255

45

Arg Cys Met Leu Thr Ile Phe Ser Leu Phe Ala Thr Lys Thr Glu Ala  
260 265 270

50

Ser Leu Leu Arg Met Leu Lys Gly Ser Pro Asp Val Tyr Leu Ser Gly  
275 280 285

Pro Ile Arg Lys Tyr Ile Thr Asp Lys Gly Gly Arg Phe His Leu Arg  
290 295 300

## 187

Trp Gly Cys Arg Glu Ile Leu Tyr Asp Glu Leu Ser Asn Gly Asp Thr  
 305 310 315 320

5 Tyr Ile Thr Gly Ile Ala Met Ser Lys Ala Thr Asn Lys Lys Leu Val  
 325 330 335

10 Lys Ala Asp Val Tyr Val Ala Ala Cys Asp Val Pro Gly Ile Lys Arg  
 340 345 350

15 Leu Ile Pro Ser Glu Trp Arg Glu Trp Asp Leu Phe Asp Asn Ile Tyr  
 355 360 365

20 Lys Leu Val Gly Val Pro Val Val Thr Val Gln Leu Arg Tyr Asn Gly  
 370 375 380

25 Trp Val Thr Glu Met Gln Asp Leu Glu Lys Ser Arg Gln Leu Arg Ala  
 385 390 395 400

30 Ala Val Gly Leu Asp Asn Leu Leu Tyr Thr Pro Asp Ala Asp Phe Ser  
 405 410 415

35 Cys Phe Ser Asp Leu Ala Leu Ser Ser Pro Glu Asp Tyr Tyr Ile Glu  
 420 425 430

Gly Gln Gly Ser Leu Ile Gln Ala Val Leu Thr Pro Gly Asp Pro Tyr  
 435 440 445

40 Met Pro Leu Pro Asn Asp Ala Ile Ile Glu Arg Val Arg Lys Gln Val  
 450 455 460

45 Leu Asp Leu Phe Pro Ser Ser Gln Gly Leu Glu Val Leu Trp Ser Ser  
 465 470 475 480

50 val Val Lys Ile Gly Gln Ser Leu Tyr Arg Glu Gly Pro Gly Lys Asp  
 485 490 495

Pro Phe Arg Pro Asp Gln Lys Thr Pro Val Lys Asn Phe Phe Leu Ala  
 500 505 510

5 Gly Ser Tyr Thr Lys Gln Asp Tyr Ile Asp Ser Met Glu Gly Ala Thr  
515 520 525

Leu Ser Gly Arg Gln Ala Ala Ala Tyr Ile Cys Ser Ala Gly Glu Asp  
530 535 540

10 Leu Ala Ala Leu Arg Lys Lys Ile Ala Ala Asp His Pro Glu Gln Leu  
545 550 555 560

15 Ile Asn Lys Asp Ser Asn Val Ser Asp Glu Leu Ser Leu Val  
565 570

20 <210> 121  
<211> 1848

<212> DNA

25 <213> Lycopersicon esculentum

30 <220>  
<221> CDS  
<222> (1) .. (1848)

35 <223>

40 <400> 121  
atg tgt acc ttg agt ttt atg tat cct aat tca ctt ctt gat ggt acc 48  
Met Cys Thr Leu Ser Phe Met Tyr Pro Asn Ser Leu Leu Asp Gly Thr  
1 5 10 15

45 tgc aag act gta gct ttg ggt gat agc aaa cca aga tac aat aaa cag 96  
Cys Lys Thr Val Ala Leu Gly Asp Ser Lys Pro Arg Tyr Asn Lys Gln  
20 25 30

50 aga agt tct tgt ttt gac cct ttg ata att gga aat tgt act gat cag 144  
Arg Ser Ser Cys Phe Asp Pro Leu Ile Ile Gly Asn Cys Thr Asp Gln  
35 40 45

189

	cag cag ctt tgt ggc ttg agt tgg ggg gtg gac aag gct aag gga aga	192
	Gln Gln Leu Cys Gly Leu Ser Trp Gly Val Asp Lys Ala Lys Gly Arg	
	50 55 60	
5	aga ggg ggt act gtt tcc aat ttg aaa gca gtt gta gat gta gac aaa	240
	Arg Gly Gly Thr Val Ser Asn Leu Lys Ala Val Val Asp Val Asp Lys	
	65 70 75 80	
10	aga gtg gag agc tat ggc agt agt gat gta gaa gga aat gag agt ggc	288
	Arg Val Glu Ser Tyr Gly Ser Ser Asp Val Glu Gly Asn Glu Ser Gly	
	85 90 95	
15	agc tat gat gcc att gtt ata ggt tca gga ata ggt gga ttg gtg gca	336
	Ser Tyr Asp Ala Ile Val Ile Gly Ser Gly Ile Gly Gly Leu Val Ala	
	100 105 110	
20	gcg acg cag ctg gcg gtt aag gga gct aag gtt tta gtt ctg gag aag	384
	Ala Thr Gln Leu Ala Val Lys Gly Ala Lys Val Leu Val Leu Glu Lys	
	115 120 125	
25	tat gtt att cct ggt gga agc tct ggc ttt tac gag agg gat ggt tat	432
	Tyr Val Ile Pro Gly Gly Ser Ser Gly Phe Tyr Glu Arg Asp Gly Tyr	
	130 135 140	
30	aag ttt gat gtt ggt tca tca gtg atg ttt gga ttc agt gat aag gga	480
	Lys Phe Asp Val Gly Ser Ser Val Met Phe Gly Phe Ser Asp Lys Gly	
	145 150 155 160	
35	aac ctc aat tta att act caa gca ttg gca gca gta gga cgt aaa tta	528
	Asn Leu Asn Leu Ile Thr Gln Ala Leu Ala Ala Val Gly Arg Lys Leu	
	165 170 175	
40	gaa gtt ata cct gac cca aca act gta cat ttc cac ctg cca aat gac	576
	Glu Val Ile Pro Asp Pro Thr Thr Val His Phe His Leu Pro Asn Asp	
	180 185 190	
45	ctt tct gtt cgt ata cac cga gag tat gat gac ttc att gaa gag ctt	624
	Leu Ser Val Arg Ile His Arg Glu Tyr Asp Asp Phe Ile Glu Glu Leu	
	195 200 205	
50	gtg agt aaa ttt cca cat gaa aag gaa ggg att atc aaa ttt tac agt	672
	Val Ser Lys Phe Pro His Glu Lys Glu Gly Ile Ile Lys Phe Tyr Ser	
	210 215 220	
55	gaa tgc tgg aag atc ttt aat tct ctg aat tca ttg gaa ctg aag tct	720
	Glu Cys Trp Lys Ile Phe Asn Ser Leu Asn Ser Leu Glu Leu Lys Ser	
	225 230 235 240	
60	ttg gag gaa ccc atc tac ctt ttt ggc cag ttc ttt aag aag ccc ctt	768



## 190

	Leu	Glu	Glu	Pro	Ile	Tyr	Leu	Phe	Gly	Gln	Phe	Phe	Lys	Lys	Pro	Leu	
					245					250					255		
5	gaa	tgc	ttg	act	ctt	gcc	tac	tat	ttg	ccc	cag	aat	gct	ggg	agc	atc	816
	Glu	Cys	Leu	Thr	Leu	Ala	Tyr	Tyr	Leu	Pro	Gln	Asn	Ala	Gly	Ser	Ile	
				260					265					270			
10	gct	cgg	aag	tat	ata	aga	gat	cct	ggg	ttg	ctg	tct	ttt	ata	gat	gca	864
	Ala	Arg	Lys	Tyr	Ile	Arg	Asp	Pro	Gly	Leu	Leu	Ser	Phe	Ile	Asp	Ala	
				275				280					285				
15	gag	tgc	ttt	atc	gtg	agt	aca	ggt	aat	gca	tta	caa	aca	cca	atg	atc	912
	Glu	Cys	Phe	Ile	Val	Ser	Thr	Val	Asn	Ala	Leu	Gln	Thr	Pro	Met	Ile	
		290					295				300						
	aat	gca	agc	atg	ggt	cta	tgt	gac	aga	cat	ttt	ggc	gga	atc	aac	tac	960
	Asn	Ala	Ser	Met	Val	Leu	Cys	Asp	Arg	His	Phe	Gly	Gly	Ile	Asn	Tyr	
	305					310				315					320		
20	ccc	ggt	ggg	gga	ggt	ggc	gag	atc	gcc	aaa	tcc	tta	gca	aaa	ggc	ttg	1008
	Pro	Val	Gly	Gly	Val	Gly	Glu	Ile	Ala	Lys	Ser	Leu	Ala	Lys	Gly	Leu	
					325				330						335		
25	gat	gat	cac	gga	agt	cag	ata	ctt	tat	agg	gca	aat	ggt	aca	agt	atc	1056
	Asp	Asp	His	Gly	Ser	Gln	Ile	Leu	Tyr	Arg	Ala	Asn	Val	Thr	Ser	Ile	
				340				345					350				
30	att	ttg	gac	aat	ggc	aaa	gct	gtg	gga	gtg	aag	ctt	tct	gac	ggg	agg	1104
	Ile	Leu	Asp	Asn	Gly	Lys	Ala	Val	Gly	Val	Lys	Leu	Ser	Asp	Gly	Arg	
			355				360						365				
35	aag	ttt	tat	gct	aaa	acc	ata	gta	tcg	aat	gct	acc	aga	tgg	gat	act	1152
	Lys	Phe	Tyr	Ala	Lys	Thr	Ile	Val	Ser	Asn	Ala	Thr	Arg	Trp	Asp	Thr	
		370					375				380						
	ttt	gga	aag	ctt	tta	aaa	gct	gag	aat	ctg	cca	aaa	gaa	gaa	gaa	aat	1200
	Phe	Gly	Lys	Leu	Leu	Lys	Ala	Glu	Asn	Leu	Pro	Lys	Glu	Glu	Glu	Asn	
	385					390				395						400	
40	ttc	cag	aaa	gct	tat	gta	aaa	gca	cct	tct	ttt	ctt	tct	att	cat	atg	1248
	Phe	Gln	Lys	Ala	Tyr	Val	Lys	Ala	Pro	Ser	Phe	Leu	Ser	Ile	His	Met	
				405				410						415			
45	gga	ggt	aaa	gca	gat	gta	ctc	cca	cca	gac	aca	gat	tgt	cac	cat	ttt	1296
	Gly	Val	Lys	Ala	Asp	Val	Leu	Pro	Pro	Asp	Thr	Asp	Cys	His	His	Phe	
				420				425					430				
50	gtc	ctc	gag	gat	gat	tgg	aca	aat	ttg	gag	aaa	cca	tat	gga	agt	ata	1344
	Val	Leu	Glu	Asp	Asp	Trp	Thr	Asn	Leu	Glu	Lys	Pro	Tyr	Gly	Ser	Ile	
			435				440						445				

## 191

	ttc ttg agt att cca aca gtt ctt gat tcc tca ttg gcc cca gaa gga	1392
	Phe Leu Ser Ile Pro Thr Val Leu Asp Ser Ser Leu Ala Pro Glu Gly	
	450 455 460	
5	cac cat att ctt cac att ttt aca aca tcg agc att gaa gat tgg gag	1440
	His His Ile Leu His Ile Phe Thr Thr Ser Ser Ile Glu Asp Trp Glu	
	465 470 475 480	
10	gga ctc tct ccg aaa gac tat gaa gcg aag aaa gag gtt gtt gct gaa	1488
	Gly Leu Ser Pro Lys Asp Tyr Glu Ala Lys Lys Glu Val Val Ala Glu	
	485 490 495	
15	agg att ata agc aga ctt gaa aaa aca ctc ttc cca ggg ctt aag tca	1536
	Arg Ile Ile Ser Arg Leu Glu Lys Thr Leu Phe Pro Gly Leu Lys Ser	
	500 505 510	
20	tct att ctc ttt aag gag gtg gga act cca aag acc cac aga cga tac	1584
	Ser Ile Leu Phe Lys Glu Val Gly Thr Pro Lys Thr His Arg Arg Tyr	
	515 520 525	
25	ctt gct cgt gat agt ggt acc tat gga cca atg cca cgc gga aca cct	1632
	Leu Ala Arg Asp Ser Gly Thr Tyr Gly Pro Met Pro Arg Gly Thr Pro	
	530 535 540	
30	aag gga ctc ctg gga atg cct ttc aat acc act gct ata gat ggt cta	1680
	Lys Gly Leu Leu Gly Met Pro Phe Asn Thr Thr Ala Ile Asp Gly Leu	
	545 550 555 560	
35	tat tgt gtt ggc gat agt tgc ttc cca gga caa ggt gtt ata gct gta	1728
	Tyr Cys Val Gly Asp Ser Cys Phe Pro Gly Gln Gly Val Ile Ala Val	
	565 570 575	
40	gcc ttt tca gga gta atg tgc gct cat cgt gtt gca gct gac tta ggg	1776
	Ala Phe Ser Gly Val Met Cys Ala His Arg Val Ala Ala Asp Leu Gly	
	580 585 590	
45	ttt gaa aaa aaa tca gat gtg ctg gac agt gct ctt ctt aga cta ctt	1824
	Phe Glu Lys Lys Ser Asp Val Leu Asp Ser Ala Leu Leu Arg Leu Leu	
	595 600 605	
50	ggt tgg tta agg aca cta gca tga	1848
	Gly Trp Leu Arg Thr Leu Ala	
	610 615	
	<210> 122	
	<211> 615	

192

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Lycopersicon esculentum

5

&lt;400&gt; 122

Met Cys Thr Leu Ser Phe Met Tyr Pro Asn Ser Leu Leu Asp Gly Thr  
 10 1 5 10 15

Cys Lys Thr Val Ala Leu Gly Asp Ser Lys Pro Arg Tyr Asn Lys Gln  
 15 20 25 30

Arg Ser Ser Cys Phe Asp Pro Leu Ile Ile Gly Asn Cys Thr Asp Gln  
 35 40 45

Gln Gln Leu Cys Gly Leu Ser Trp Gly Val Asp Lys Ala Lys Gly Arg  
 50 55 60

Arg Gly Gly Thr Val Ser Asn Leu Lys Ala Val Val Asp Val Asp Lys  
 65 70 75 80

Arg Val Glu Ser Tyr Gly Ser Ser Asp Val Glu Gly Asn Glu Ser Gly  
 30 85 90 95

Ser Tyr Asp Ala Ile Val Ile Gly Ser Gly Ile Gly Gly Leu Val Ala  
 100 105 110  
 35

Ala Thr Gln Leu Ala Val Lys Gly Ala Lys Val Leu Val Leu Glu Lys  
 115 120 125

Tyr Val Ile Pro Gly Gly Ser Ser Gly Phe Tyr Glu Arg Asp Gly Tyr  
 130 135 140  
 40

Lys Phe Asp Val Gly Ser Ser Val Met Phe Gly Phe Ser Asp Lys Gly  
 145 150 155 160  
 45

Asn Leu Asn Leu Ile Thr Gln Ala Leu Ala Ala Val Gly Arg Lys Leu  
 165 170 175  
 50

## 193

Glu Val Ile Pro Asp Pro Thr Thr Val His Phe His Leu Pro Asn Asp  
 180 185 190  
 5

Leu Ser Val Arg Ile His Arg Glu Tyr Asp Asp Phe Ile Glu Glu Leu  
 195 200 205

10

Val Ser Lys Phe Pro His Glu Lys Glu Gly Ile Ile Lys Phe Tyr Ser  
 210 215 220

15

Glu Cys Trp Lys Ile Phe Asn Ser Leu Asn Ser Leu Glu Leu Lys Ser  
 225 230 235 240

20

Leu Glu Glu Pro Ile Tyr Leu Phe Gly Gln Phe Phe Lys Lys Pro Leu  
 245 250 255

25

Glu Cys Leu Thr Leu Ala Tyr Tyr Leu Pro Gln Asn Ala Gly Ser Ile  
 260 265 270

30

Ala Arg Lys Tyr Ile Arg Asp Pro Gly Leu Leu Ser Phe Ile Asp Ala  
 275 280 285

35

Glu Cys Phe Ile Val Ser Thr Val Asn Ala Leu Gln Thr Pro Met Ile  
 290 295 300

40

Asn Ala Ser Met Val Leu Cys Asp Arg His Phe Gly Gly Ile Asn Tyr  
 305 310 315 320

Pro Val Gly Gly Val Gly Glu Ile Ala Lys Ser Leu Ala Lys Gly Leu  
 325 330 335

45

Asp Asp His Gly Ser Gln Ile Leu Tyr Arg Ala Asn Val Thr Ser Ile  
 340 345 350

50

Ile Leu Asp Asn Gly Lys Ala Val Gly Val Lys Leu Ser Asp Gly Arg  
 355 360 365

## 194

	Lys	Phe	Tyr	Ala	Lys	Thr	Ile	Val	Ser	Asn	Ala	Thr	Arg	Trp	Asp	Thr	
	370							375								380	
5	Phe	Gly	Lys	Leu	Leu	Lys	Ala	Glu	Asn	Leu	Pro	Lys	Glu	Glu	Glu	Asn	
	385					390					395					400	
10	Phe	Gln	Lys	Ala	Tyr	Val	Lys	Ala	Pro	Ser	Phe	Leu	Ser	Ile	His	Met	
					405					410					415		
15	Gly	Val	Lys	Ala	Asp	Val	Leu	Pro	Pro	Asp	Thr	Asp	Cys	His	His	Phe	
				420					425					430			
20	Val	Leu	Glu	Asp	Asp	Trp	Thr	Asn	Leu	Glu	Lys	Pro	Tyr	Gly	Ser	Ile	
		435						440					445				
25	Phe	Leu	Ser	Ile	Pro	Thr	Val	Leu	Asp	Ser	Ser	Leu	Ala	Pro	Glu	Gly	
	450						455					460					
30	His	His	Ile	Leu	His	Ile	Phe	Thr	Thr	Ser	Ser	Ile	Glu	Asp	Trp	Glu	
	465					470					475					480	
35	Gly	Leu	Ser	Pro	Lys	Asp	Tyr	Glu	Ala	Lys	Lys	Glu	Val	Val	Ala	Glu	
				485						490					495		
40	Arg	Ile	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu	Lys	Thr	Leu	Phe	Pro	Gly	Leu	Lys	Ser	
				500					505					510			
45	Ser	Ile	Leu	Phe	Lys	Glu	Val	Gly	Thr	Pro	Lys	Thr	His	Arg	Arg	Tyr	
		515						520					525				
50	Leu	Ala	Arg	Asp	Ser	Gly	Thr	Tyr	Gly	Pro	Met	Pro	Arg	Gly	Thr	Pro	
	530						535					540					
55	Lys	Gly	Leu	Leu	Gly	Met	Pro	Phe	Asn	Thr	Thr	Ala	Ile	Asp	Gly	Leu	
	545					550					555					560	
60	Tyr	Cys	Val	Gly	Asp	Ser	Cys	Phe	Pro	Gly	Gln	Gly	Val	Ile	Ala	Val	
					565					570					575		

Ala Phe Ser Gly Val Met Cys Ala His Arg Val Ala Ala Asp Leu Gly  
580 585 590

5

Phe Glu Lys Lys Ser Asp Val Leu Asp Ser Ala Leu Leu Arg Leu Leu  
595 600 605

10

Gly Trp Leu Arg Thr Leu Ala  
610 615

15 <210> 123

<211> 1233

<212> DNA

20 <213> Tagetes erecta

25 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(1233)

30 <223>

35 <400> 123

atg gcc aca cac aaa ctc ctt caa ttc acc acc aat ctc cca cca tct 48  
Met Ala Thr His Lys Leu Leu Gln Phe Thr Thr Asn Leu Pro Pro Ser  
1 5 10 15

40 tct tct tca atc tct act ggc tgt tca ctc tcc ccc ttc ttc ctc aaa 96  
Ser Ser Ser Ile Ser Thr Gly Cys Ser Leu Ser Pro Phe Phe Leu Lys  
20 25 30

tca tct tct cat tcc cct aac cct cgc cga cac cgc cgc tcc gcc gta 144  
45 Ser Ser Ser His Ser Pro Asn Pro Arg Arg His Arg Arg Ser Ala Val  
35 40 45

tgc tgc tct ttc gcc tca ctc gac tct gca aaa atc aaa gtc gtt ggc 192  
Cys Cys Ser Phe Ala Ser Leu Asp Ser Ala Lys Ile Lys Val Val Gly  
50 50 55 60

	gtc ggt ggt ggt ggc aac aat gcc gtt aac cgc atg att ggt agc ggc	240
	Val Gly Gly Gly Gly Asn Asn Ala Val Asn Arg Met Ile Gly Ser Gly	
	65 70 75 80	
5	tta cag ggt gtt gat ttt tac gcc att aac acg gac tca caa gcg ctt	288
	Leu Gln Gly Val Asp Phe Tyr Ala Ile Asn Thr Asp Ser Gln Ala Leu	
	85 90 95	
10	ctg caa tct gtt gca cat aac cct att caa att ggg gag ctt ttg act	336
	Leu Gln Ser Val Ala His Asn Pro Ile Gln Ile Gly Glu Leu Leu Thr	
	100 105 110	
15	cgt gga tta ggt act ggt ggg aac ccg ctt ttg gga gaa cag gct gcg	384
	Arg Gly Leu Gly Thr Gly Gly Asn Pro Leu Leu Gly Glu Gln Ala Ala	
	115 120 125	
20	gag gag tcg aag gaa gcg att ggg aat gcg ctt aaa ggg tcg gat ctt	432
	Glu Glu Ser Lys Glu Ala Ile Gly Asn Ala Leu Lys Gly Ser Asp Leu	
	130 135 140	
25	gtg ttt ata aca gca ggt atg ggt ggt ggg acg ggt tcg ggt gct gct	480
	Val Phe Ile Thr Ala Gly Met Gly Gly Gly Thr Gly Ser Gly Ala Ala	
	145 150 155 160	
	cca gtt gta gcg cag ata gcg aaa gaa gca ggg tat tta act gtt ggt	528
	Pro Val Val Ala Gln Ile Ala Lys Glu Ala Gly Tyr Leu Thr Val Gly	
	165 170 175	
30	gtt gta acg tac cca ttc agc ttt gaa ggc cgt aaa aga tca gta cag	576
	Val Val Thr Tyr Pro Phe Ser Phe Glu Gly Arg Lys Arg Ser Val Gln	
	180 185 190	
35	gcg tta gag gct att gag aag ctg caa aag aac gtt gac aca ctt ata	624
	Ala Leu Glu Ala Ile Glu Lys Leu Gln Lys Asn Val Asp Thr Leu Ile	
	195 200 205	
40	gtg att cca aat gac cgt ttg ctg gat att gct gat gaa aac acg cct	672
	Val Ile Pro Asn Asp Arg Leu Leu Asp Ile Ala Asp Glu Asn Thr Pro	
	210 215 220	
45	ctt cag gat gct ttt ctt ctt gct gat gat gta ctc cgc caa gga gtt	720
	Leu Gln Asp Ala Phe Leu Leu Ala Asp Asp Val Leu Arg Gln Gly Val	
	225 230 235 240	
	caa gga atc tca gat ata att aca ata cct ggg ctg gta aat gtg gac	768
	Gln Gly Ile Ser Asp Ile Ile Thr Ile Pro Gly Leu Val Asn Val Asp	
	245 250 255	
50	ttt gca gac gtt aaa gca gtc atg aaa gat tct gga act gca atg ctt	816

## 197

[illegible]

50



198

&lt;400&gt; 124

Met Ala Thr His Lys Leu Leu Gln Phe Thr Thr Asn Leu Pro Pro Ser  
 1 5 10 15  
 5

Ser Ser Ser Ile Ser Thr Gly Cys Ser Leu Ser Pro Phe Phe Leu Lys  
 20 25 30

10  
 Ser Ser Ser His Ser Pro Asn Pro Arg Arg His Arg Arg Ser Ala Val  
 35 40 45

15 Cys Cys Ser Phe Ala Ser Leu Asp Ser Ala Lys Ile Lys Val Val Gly  
 50 55 60

20 Val Gly Gly Gly Gly Asn Asn Ala Val Asn Arg Met Ile Gly Ser Gly  
 65 70 75 80

Leu Gln Gly Val Asp Phe Tyr Ala Ile Asn Thr Asp Ser Gln Ala Leu  
 85 90 95  
 25

Leu Gln Ser Val Ala His Asn Pro Ile Gln Ile Gly Glu Leu Leu Thr  
 100 105 110

30 Arg Gly Leu Gly Thr Gly Gly Asn Pro Leu Leu Gly Glu Gln Ala Ala  
 115 120 125

35 Glu Glu Ser Lys Glu Ala Ile Gly Asn Ala Leu Lys Gly Ser Asp Leu  
 130 135 140

40 Val Phe Ile Thr Ala Gly Met Gly Gly Gly Thr Gly Ser Gly Ala Ala  
 145 150 155 160

Pro Val Val Ala Gln Ile Ala Lys Glu Ala Gly Tyr Leu Thr Val Gly  
 165 170 175  
 45

Val Val Thr Tyr Pro Phe Ser Phe Glu Gly Arg Lys Arg Ser Val Gln  
 180 185 190  
 50

	Ala	Leu	Glu	Ala	Ile	Glu	Lys	Leu	Gln	Lys	Asn	Val	Asp	Thr	Leu	Ile
	195				200				205							
5	Val	Ile	Pro	Asn	Asp	Arg	Leu	Leu	Asp	Ile	Ala	Asp	Glu	Asn	Thr	Pro
	210				215				220							
10	Leu	Gln	Asp	Ala	Phe	Leu	Leu	Ala	Asp	Asp	Val	Leu	Arg	Gln	Gly	Val
	225				230				235				240			
15	Gln	Gly	Ile	Ser	Asp	Ile	Ile	Thr	Ile	Pro	Gly	Leu	Val	Asn	Val	Asp
					245				250				255			
20	Phe	Ala	Asp	Val	Lys	Ala	Val	Met	Lys	Asp	Ser	Gly	Thr	Ala	Met	Leu
	260				265				270							
25	Gly	Val	Gly	Val	Ser	Ser	Ser	Lys	Asn	Arg	Ala	Glu	Glu	Ala	Ala	Glu
	275				280				285							
30	Gln	Ala	Thr	Leu	Ala	Pro	Leu	Ile	Gly	Ser	Ser	Ile	Gln	Ser	Ala	Thr
	290				295				300							
35	Gly	Val	Val	Tyr	Asn	Ile	Thr	Gly	Gly	Lys	Asp	Ile	Thr	Leu	Gln	Glu
	305				310				315				320			
40	Val	Asn	Arg	Val	Ser	Gln	Val	Val	Thr	Ser	Leu	Ala	Asp	Pro	Ser	Ala
					325				330				335			
45	Asn	Ile	Ile	Phe	Gly	Ala	Val	Val	Asp	Glu	Arg	Tyr	Asn	Gly	Glu	Ile
	340				345				350							
50	His	Val	Thr	Ile	Val	Ala	Thr	Gly	Phe	Ala	Gln	Ser	Phe	Gln	Lys	Ser
	355				360				365							
55	Leu	Leu	Ala	Asp	Pro	Lys	Gly	Ala	Lys	Leu	Val	Asp	Arg	Asn	Gln	Glu
	370				375				380							
60	Pro	Thr	Gln	Pro	Leu	Thr	Ser	Ala	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Pro	Ser	Pro
	385				390				395				400			

Ala Pro Ser Arg Ser Arg Lys Leu Phe Phe  
 405 410

5

<210> 125

<211> 891

10

<212> DNA

<213> Tagetes erecta

15

<220>

<221> CDS

20

<222> (1) .. (891)

<223>

25

<400> 125

atg aca tcc ctg agg ttt cta aca gaa ccc tca ctt gta tgc tca tcc 48  
 Met Thr Ser Leu Arg Phe Leu Thr Glu Pro Ser Leu Val Cys Ser Ser  
 30 1 5 10 15

act ttc ccc aca ttc aat ccc cta cac aaa acc cta act aaa cca aca 96  
 Thr Phe Pro Thr Phe Asn Pro Leu His Lys Thr Leu Thr Lys Pro Thr  
 20 25 30

35

cca aaa ccc tac cca aag cca cca cca att cgc tcc gtc ctt caa tac 144  
 Pro Lys Pro Tyr Pro Lys Pro Pro Pro Ile Arg Ser Val Leu Gln Tyr  
 35 40 45

40

aat cgc aaa cca gag ctc gcc gga gac act cca cga gtc gtc gca atc 192  
 Asn Arg Lys Pro Glu Leu Ala Gly Asp Thr Pro Arg Val Val Ala Ile  
 50 55 60

45

gac gcc gac gtt ggt cta cgt aac ctc gat ctt ctt ctc ggt ctc gaa 240  
 Asp Ala Asp Val Gly Leu Arg Asn Leu Asp Leu Leu Leu Gly Leu Glu  
 65 70 75 80

50

aac cgc gtc aat tac acc gtc gtt gaa gtt ctc aac ggc gat tgc aga 288  
 Asn Arg Val Asn Tyr Thr Val Val Glu Val Leu Asn Gly Asp Cys Arg  
 85 90 95

## 201

	ctc gac caa gcc cta gtt cgt gat aaa cgc tgg tca aat ttc gaa ttg	336
	Leu Asp Gln Ala Leu Val Arg Asp Lys Arg Trp Ser Asn Phe Glu Leu	
	100 105 110	
5	ctt tgt att tca aaa cct agg tca aaa ttg cct tta gga ttt ggg gga	384
	Leu Cys Ile Ser Lys Pro Arg Ser Lys Leu Pro Leu Gly Phe Gly Gly	
	115 120 125	
10	aaa gct tta gtt tgg ctt gat gca tta aaa gat agg caa gaa ggt tgc	432
	Lys Ala Leu Val Trp Leu Asp Ala Leu Lys Asp Arg Gln Glu Gly Cys	
	130 135 140	
15	ccg gat ttt ata ctt ata gat tgt cct gca ggt att gat gcc ggg ttc	480
	Pro Asp Phe Ile Leu Ile Asp Cys Pro Ala Gly Ile Asp Ala Gly Phe	
	145 150 155 160	
20	ata acc gcc att aca ccg gct aac gaa gcc gta tta gtt aca aca cct	528
	Ile Thr Ala Ile Thr Pro Ala Asn Glu Ala Val Leu Val Thr Thr Pro	
	165 170 175	
25	gat att act gca ttg aga gat gca gat aga gtt aca ggc ttg ctt gaa	576
	Asp Ile Thr Ala Leu Arg Asp Ala Asp Arg Val Thr Gly Leu Leu Glu	
	180 185 190	
30	tgt gat gga att agg gat att aaa atg att gtg aac aga gtt aga act	624
	Cys Asp Gly Ile Arg Asp Ile Lys Met Ile Val Asn Arg Val Arg Thr	
	195 200 205	
35	gat ttg ata agg ggt gaa gat atg atg tca gtt ctt gat gtt caa gag	672
	Asp Leu Ile Arg Gly Glu Asp Met Met Ser Val Leu Asp Val Gln Glu	
	210 215 220	
40	atg ttg gga ttg tca ttg ttg agt gat acc cga gga ttc gaa gtg att	720
	Met Leu Gly Leu Ser Leu Leu Ser Asp Thr Arg Gly Phe Glu Val Ile	
	225 230 235 240	
45	cgg agt acg aat aga ggg ttt ccg ctt gtg ttg aac aag cct ccg act	768
	Arg Ser Thr Asn Arg Gly Phe Pro Leu Val Leu Asn Lys Pro Pro Thr	
	245 250 255	
50	tta gca gga ttg gca ttt gag cag gct gct tgg aga ttg gtt gag caa	816
	Leu Ala Gly Leu Ala Phe Glu Gln Ala Ala Trp Arg Leu Val Glu Gln	
	260 265 270	
55	gat agc atg aag gct gtg atg gtg gag gaa gaa cct aaa aag agg gga	864
	Asp Ser Met Lys Ala Val Met Val Glu Glu Glu Pro Lys Lys Arg Gly	
	275 280 285	
60	ttt ttc tcg ttt ttt gga ggt tag tga	891

## 202

Phe Phe Ser Phe Phe Gly Gly  
 290 295

5 <210> 126

<211> 295

<212> PRT

10

<213> Tagetes erecta

15 <400> 126

Met Thr Ser Leu Arg Phe Leu Thr Glu Pro Ser Leu Val Cys Ser Ser  
 1 5 10 15

20

Thr Phe Pro Thr Phe Asn Pro Leu His Lys Thr Leu Thr Lys Pro Thr  
 20 25 30

25 Pro Lys Pro Tyr Pro Lys Pro Pro Pro Ile Arg Ser Val Leu Gln Tyr  
 35 40 45

30

Asn Arg Lys Pro Glu Leu Ala Gly Asp Thr Pro Arg Val Val Ala Ile  
 50 55 60

35

Asp Ala Asp Val Gly Leu Arg Asn Leu Asp Leu Leu Leu Gly Leu Glu  
 65 70 75 80

Asn Arg Val Asn Tyr Thr Val Val Glu Val Leu Asn Gly Asp Cys Arg  
 85 90 95

40

Leu Asp Gln Ala Leu Val Arg Asp Lys Arg Trp Ser Asn Phe Glu Leu  
 100 105 110

45 Leu Cys Ile Ser Lys Pro Arg Ser Lys Leu Pro Leu Gly Phe Gly Gly  
 115 120 125

50

Lys Ala Leu Val Trp Leu Asp Ala Leu Lys Asp Arg Gln Glu Gly Cys  
 130 135 140

## 203

Pro Asp Phe Ile Leu Ile Asp Cys Pro Ala Gly Ile Asp Ala Gly Phe  
145 150 155 160

5

Ile Thr Ala Ile Thr Pro Ala Asn Glu Ala Val Leu Val Thr Thr Pro  
165 170 175

10

Asp Ile Thr Ala Leu Arg Asp Ala Asp Arg Val Thr Gly Leu Leu Glu  
180 185 190

15

Cys Asp Gly Ile Arg Asp Ile Lys Met Ile Val Asn Arg Val Arg Thr  
195 200 205

20

Asp Leu Ile Arg Gly Glu Asp Met Met Ser Val Leu Asp Val Gln Glu  
210 215 220

25

Met Leu Gly Leu Ser Leu Leu Ser Asp Thr Arg Gly Phe Glu Val Ile  
225 230 235 240

30

Arg Ser Thr Asn Arg Gly Phe Pro Leu Val Leu Asn Lys Pro Pro Thr  
245 250 255

35

Leu Ala Gly Leu Ala Phe Glu Gln Ala Ala Trp Arg Leu Val Glu Gln  
260 265 270

40

Asp Ser Met Lys Ala Val Met Val Glu Glu Glu Pro Lys Lys Arg Gly  
275 280 285

45

Phe Phe Ser Phe Phe Gly Gly  
290 295

<210> 127

<211> 332

<212> DNA

<213> Tagetes erecta

50

**<220>**

5 <221> CDS

<222> (1) .. (330)

<223>

10

<400> 127

15 aag ctt gca cga gcc tct ctc tat ttt tac act tca atg gcg gca gca 48  
Lys Leu Ala Arg Ala Ser Leu Tyr Phe Tyr Thr Ser Met Ala Ala Ala  
1 5 10 15

att gct gtc cct tgt agc tca aga cca ttt ggc tta ggt cga atg cgg 96  
Ile Ala Val Pro Cys Ser Ser Arg Pro Phe Gly Leu Gly Arg Met Arg  
20 25 30

tta ctt ggt cat aaa ccc aca acc ata act tgt cac ttc ccc ttt tct 144  
Leu Leu Gly His Lys Pro Thr Thr Ile Thr Cys His Phe Pro Phe Ser  
35 40 45

ttt tct atc aaa tca ttt acc cca att gtt agg ggc aga aga tgt act 192  
 Phe Ser Ile Lys Ser Phe Thr Pro Ile Val Arg Gly Arg Arg Cys Thr  
 50 55 60

30 gtt tgt ttt gtt gcc ggt ggc gac agt aat agt aac agt aat aat aat 240  
Val Cys Phe Val Ala Gly Gly Asp Ser Asn Ser Asn Ser Asn Asn Asn  
65 70 75 80

```

35  agt gac agt aat agt aat aat ccg ggt ctg gat tta aac ccg gcg gtt      288
    Ser Asp Ser Asn Ser Asn Asn Pro Gly Leu Asp Leu Asn Pro Ala Val
        85                90                95

```

atg aac cgt aac cgt ttg gtt gaa gaa aaa atg gag agg tcg ac 332  
Met Asn Arg Asn Arg Leu Val Glu Glu Lys Met Glu Arg Ser  
40 100 105 110

<210> 128

45       $\langle 211 \rangle$       110

<212> PRT

50            <213>   Tagetes erecta

## 205

<400> 128

5 Lys Leu Ala Arg Ala Ser Leu Tyr Phe Tyr Thr Ser Met Ala Ala Ala  
1 5 10 15

10 Ile Ala Val Pro Cys Ser Ser Arg Pro Phe Gly Leu Gly Arg Met Arg  
20 25 30

15 Leu Leu Gly His Lys Pro Thr Thr Ile Thr Cys His Phe Pro Phe Ser  
35 40 45

Phe Ser Ile Lys Ser Phe Thr Pro Ile Val Arg Gly Arg Arg Cys Thr  
50 55 60

20 Val Cys Phe Val Ala Gly Gly Asp Ser Asn Ser Asn Ser Asn Asn Asn  
65 70 75 80

25 Ser Asp Ser Asn Ser Asn Asn Pro Gly Leu Asp Leu Asn Pro Ala Val  
85 90 95

30 Met Asn Arg Asn Arg Leu Val Glu Glu Lys Met Glu Arg Ser  
100 105 110

<210> 129

35 <211> 37

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

40

<220>

45 <221> Primer

<222> (1) .. (37)

<223>

50



5           <400> 129  
            gcgcatgcat ctagaaatga tccagttaga acaacca 37

10           <210> 130  
            <211> 37  
            <212> DNA  
            <213> Künstliche Sequenz

15           <220>  
            <221> Primer  
20           <222> (1) .. (37)  
            <223>

25           <400> 130  
            gcgcatgctc tagactatatt tgctttgtaa atttctg 37

30           <210> 131  
            <211> 792  
35           <212> DNA  
            <213> Nostoc punctiforme ATCC 29133

40           <220>  
            <221> CDS  
45           <222> (5) .. (775)  
            <223>

50

## 207

<400> 131  
 gcgc atg cat cta gaa atg atc cag tta gaa caa cca ctc agt cat caa 49  
 Met His Leu Glu Met Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln  
 1 5 10 15  
 5 gca aaa ctg act cca gta ctg aga agt aaa tct cag ttt aag ggg ctt 97  
 Ala Lys Leu Thr Pro Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu  
 20 25 30  
 10 ttc att gct att gtc att gtt agc gca tgg gtc att agc ctg agt tta 145  
 Phe Ile Ala Ile Val Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu  
 35 40 45  
 15 tta ctt tcc ctt gac atc tca aag cta aaa ttt tgg atg tta ttg cct 193  
 Leu Leu Ser Leu Asp Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro  
 50 55 60  
 20 gtt ata cta tgg caa aca ttt tta tat acg gga tta ttt att aca tct 241  
 Val Ile Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser  
 65 70 75  
 cat gat gcc atg cat ggc gta gta ttt ccc caa aac acc aag att aat 289  
 His Asp Ala Met His Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn  
 80 85 90 95  
 25 cat ttg att gga aca ttg acc cta tcc ctt tat ggt ctt tta cca tat 337  
 His Leu Ile Gly Thr Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr  
 100 105 110  
 30 caa aaa cta ttg aaa aaa cat tgg tta cac cac cac aat cca gca agc 385  
 Gln Lys Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser  
 115 120 125  
 35 tca ata gac ccg gat ttt cac aat ggt aaa cac caa agt ttc ttt gct 433  
 Ser Ile Asp Pro Asp Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala  
 130 135 140  
 40 tgg tat ttt cat ttt atg aaa ggt tac tgg agt tgg ggg caa ata att 481  
 Trp Tyr Phe His Phe Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile  
 145 150 155  
 45 gcg ttg act att att tat aac ttt gct aaa tac ata ctc cat atc cca 529  
 Ala Leu Thr Ile Ile Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro  
 160 165 170 175  
 agt gat aat cta act tac ttt tgg gtg cta ccc tcg ctt tta agt tca 577  
 Ser Asp Asn Leu Thr Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser  
 180 185 190  
 50 tta caa tta ttc tat ttt ggt act ttt tta ccc cat agt gaa cca ata 625

## 208

Leu Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile  
 195 200 205

5 ggg ggt tat gtt cag cct cat tgt gcc caa aca att agc cgt cct att 673  
 Gly Gly Tyr Val Gln Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile  
 210 215 220

10 tgg tgg tca ttt atc acg tgc tat cat ttt ggc tac cac gag gaa cat 721  
 Trp Trp Ser Phe Ile Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His  
 225 230 235

15 cac gaa tat cct cat att tct tgg tgg cag tta cca gaa att tac aaa 769  
 His Glu Tyr Pro His Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys  
 240 245 250 255

gca aaa tagtctagag catgcgc 792  
 Ala Lys

20 <210> 132  
 <211> 257

25 <212> PRT  
 <213> Nostoc punctiforme ATCC 29133

30 <400> 132

35 Met His Leu Glu Met Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala  
 1 5 10 15

Lys Leu Thr Pro Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe  
 20 25 30

40 Ile Ala Ile Val Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu  
 35 40 45

45 Leu Ser Leu Asp Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Val  
 50 55 60

50 Ile Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His  
 65 70 75 80

[illegible]

50

210

<210> 133

<211> 26

5 <212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

10

<220>

<221> Primer

15 <222> (1) .. (26)

<223>

20

<400> 133  
gtcgaccctg ctttaatgag atatgc

25 <210> 134

<211> 27

<212> DNA

30 <213> Künstliche Sequenz

35 <220>

<221> Primer

<222> (1) .. (27)

40 <223>

45 <400> 134  
ctcgagcttg gacaatcagt aaattga

50 <210> 135

26

27

211

<211> 210

<212> DNA

5 <213> Agrobacterium tumefaciens

<220>

10 <221> Terminator

<222> (1)..(210)

15 <223>

<400> 135

20 gtcgaccctg ctttaatgag atatgcgaga cgcctatgat cgcgatgat ttgctttcaa 60

ttctgttggtg cacgttgtaa aaaacctgag catgtgttagc tcagatcctt accgccggtt 120

tcggttcatt ctaatgaata tatcacccgt tactatcgta tttttatgaa taatattctc 180

25 cgttcaattt actgattgtc caagctcgag 210

<210> 136

30 <211> 37

<212> DNA

35 <213> Künstliche Sequenz

<220>

40 <221> Primer

<222> (1)..(37)

45 <223>

<400> 136

50 cccgggaatt cttcattatt tcgattttga tttcgtg 37

<210> 137

5 <211> 38

<212> DNA

10 <213> Künstliche Sequenz

<220>

15 <221> Primer

<222> (1) .. (38)

20 <223>

<400> 137  
aagcttggtt gatcagaaga agaagaagaa gatgaact 38

25

<210> 138

<211> 652

30 <212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

35 <220>

<221> Promotor

40 <222> (1) .. (652)

<223>

45

<400> 138  
cccgggaatt cttcattatt tcgattttga tttcgtgacc agcgaacgca gaataccttg 60

50 ttgtgtaata ctttaccggt gtaaatacaa aacaaaaagg cttttgagct tttttagtt 120

## 213

	gaatttctct ggctgatctt ttctgtacag attcatatat ctgcagagac gatattcattg	180
	attatttgag cttcttttga actatttcgt gtaatttggg atgagagctc tatgtatgtg	240
5	tgtaaaacttt gaagacaaca agaaaggtaa caagtgaggg agggatgact ccatgtcaaa	300
	atagatgtca taagaggccc atcaataagt gcttgagccc attagctagc ccagtaacta	360
10	ccagattgtg agatggatgt gtgaacagtt ttttttttga tgtaggactg aaatgtgaac	420
	aacaggcgca tgaaaggcta aattaggaca atgataagca gaaataactt atcctctcta	480
15	acacttggcc tcacattgcc cttcacacaa tccacacaca tccaatcaca acctcatcat	540
	atatctcccg ctaatctttt tttctttgat cttttttttt ttgcttatta tttttttgac	600
	tttgatctcc catcagttca tcttcttctt cttcttctga tcaaccaagc tt	652
20		
	<210> 139	
	<211> 29	
25	<212> DNA	
	<213> Künstliche Sequenz	
30		
	<220>	
	<221> Primer	
35	<222> (1) .. (29)	
	<223>	
40		
	<400> 139	
	gagctctagc gcaatcttat gtggtacaa	29
45	<210> 140	
	<211> 29	
	<212> DNA	
50		



<213> Künstliche Sequenz

5 <220>

<221> Primer

<222> (1) .. (29)

10 <223>

15 <400> 140  
aagcttttct tgaaagtaaa gattgagtc 29

<210> 141

20 <211> 1773

<212> DNA

25 <213> Petunia hybrida

<220>

30 <221> Promotor

<222> (1) .. (1773)

35 <223>

<400> 141

40 gagctctagc gcaatcttat gtggtacaaa tcttgattag tcgggaaaaa atgatgtggc 60

cctacaaatg gttggaggat gggagatttg gctctatcta gagttatgtg gttgttgaag 120

catttggtta ctctctgctg tggtagtttg catatccaca ttgtctcctt ccacttttat 180

45 gacaattacg tgaaagttat ggggtgtttt gtctattttt gtcgaggcct ttcttttcct 240

tccaggttgt tgaagatggt ccaattcgat tagaataatg ttttgagctt tagcatattc 300

50 tctctcgttt acacgattat agtaataatg atataggatg acagaagttg acacataaat 360

	tttttattct ctccatttac tttaatccaa atctcaccta ccctaaactt ctttaatatg	420
	tattcaatag tctatccgag taaattgtaa atttaacaac cattgataat attgacacct	480
5	actaacatat actagtaaag agaattattaa catggcacat ataatttgat gcaaaatgag	540
	tatgatgaaa tttaaaccca aaatctcttg attttgacag tgtcaccttg acttgттаac	600
10	taataagtca tgttttagtg gcagaaagac aaactcatcc accaactgta tagcaataaa	660
	aaatagaaga atcttcctga ggcaaagttt tggaaaaatt aagagtggct gagatttaat	720
	ttcaacagga attagttcca cttaactttt aggttacgat acagtgctaa ttaaataact	780
15	taattgtatt agatatttct tgcacctaaa aaatttaaaa actgaaaaaa ggtagcaatc	840
	aaaataaaca aaaggacaaa ataagtgaaa ggtacagcca ccaaccctgg cggctcactg	900
20	tttgttggtt aaaacgtaga cttacaccta ccaaaatcta caactaaaat gaggcaataa	960
	tactttgccc aaaattacca agaaaagaaa aagaaaggaa tcccttaata ttactctcct	1020
	ccatttcaca ataaatatcc tagtttgact taaattagag tttaaaaaat gaaagacgac	1080
25	ttttaaaact tgtaatctaa aataaatcat agttaaatgt gtggctataa atcattgtat	1140
	taacggtaaa gtggttaagtt taaaagttaa ttgttttcaa atataaaaatt gtactatcat	1200
30	tctttttgga atggactaat aagaaaacta tgacatccat tatggagcgg agggagtatc	1260
	tccttttaac aataaccttt gtcccttcaa ttcaattatc agtatgcaaa cattaaaaat	1320
	tattattgat gttaagtacc acatcatcct taatgataga atcatcgtag aacgcttttc	1380
35	caggcacaca ttcaaactag ttagaccagt accacacatc gaatattoca gacttctttg	1440
	tttgaatagt cgactacatt ggataatgga acttctcgaa ttaacttcga attagtcgag	1500
40	cccaaaataa tatatacgtc ggggtggaaaa ctataaaatg tttgacaaaa atgtcaaatt	1560
	aatatatcaa tctgcaacaa ccttttcacc ttgagaacac agctgaaatt ttttaciaag	1620
	gtagttggtg aagctagtca gcgaatccca ttaccttcca ctctacctaa ccccttcac	1680
45	caacaacaaa tttctgtaat ttaaaaacta gccaaaaag aactctcttt taciaagagc	1740
	caaagactca atctttactt tcaagaaaag ctt	1773
50		

- <210> 142
- <211> 39
- 5 <212> DNA
- <213> Künstliche Sequenz
- 10
- <220>
- <221> Primer
- 15 <222> (1)..(39)
- <223>
- 20
- <400> 142  
gcgcatgcat ctagaaatga atttttgtga taaaccagt 39
- 25 <210> 143
- <211> 37
- <212> DNA
- 30 <213> Künstliche Sequenz
- 35 <220>
- <221> Primer
- <222> (1)..(37)
- 40 <223>
- 45 <400> 143  
gcgcatgctc tagattacga attgggttact gaattgt 37
- <210> 144
- 50

217

&lt;211&gt; 819

&lt;212&gt; DNA

5 &lt;213&gt; Nostoc punctiforme ATCC 29133

&lt;220&gt;

10

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (5)..(802)

15 &lt;223&gt;

&lt;400&gt; 144

20	gcgc atg cat cta gaa atg aat ttt tgt gat aaa cca gtt agc tat tat	49
	Met His Leu Glu Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr	
	1 5 10 15	
25	ggt gca ata gag caa tta agt gct aaa gaa gat act gtt tgg ggg ctg	97
	Val Ala Ile Glu Gln Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu	
	20 25 30	
30	gtg att gtc ata gta att att agt ctt tgg gta gct agt ttg gct ttt	145
	Val Ile Val Ile Val Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe	
	35 40 45	
35	tta cta gct att aat tat gcc aaa gtc cca att tgg ttg ata cct att	193
	Leu Leu Ala Ile Asn Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile	
	50 55 60	
40	gca ata gtt tgg caa atg ttc ctt tat aca ggg cta ttt att act gca	241
	Ala Ile Val Trp Gln Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala	
	65 70 75	
45	cat gat gct atg cat ggg tca gtt tat cgt aaa aat ccc aaa att aat	289
	His Asp Ala Met His Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn	
	80 85 90 95	
50	aat ttt atc ggt tca cta gct gta gcg ctt tac gct gtg ttt cca tat	337
	Asn Phe Ile Gly Ser Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr	
	100 105 110	
50	caa cag atg tta aag aat cat tgc tta cat cat cgt cat cct gct agc	385
	Gln Gln Met Leu Lys Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser	
	115 120 125	

## 218

	gaa gtt gac cca gat ttt cat gat ggt aag aga aca aac gct att ttc	433
	Glu Val Asp Pro Asp Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe	
	130 135 140	
5	tgg tat ctc cat ttc atg ata gaa tac tcc agt tgg caa cag tta ata	481
	Trp Tyr Leu His Phe Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile	
	145 150 155	
10	gta cta act atc cta ttt aat tta gct aaa tac gtt ttg cac atc cat	529
	Val Leu Thr Ile Leu Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His	
	160 165 170 175	
15	caa ata aat ctc atc tta ttt tgg agt att cct cca att tta agt tcc	577
	Gln Ile Asn Leu Ile Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser	
	180 185 190	
20	att caa ctg ttt tat ttc gga aca ttt ttg cct cat cga gaa ccc aag	625
	Ile Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys	
	195 200 205	
25	aaa gga tat gtt tat ccc cat tgc agc caa aca ata aaa ttg cca act	673
	Lys Gly Tyr Val Tyr Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr	
	210 215 220	
	ttt ttg tca ttt atc gct tgc tac cac ttt ggt tat cat gaa gaa cat	721
	Phe Leu Ser Phe Ile Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His	
	225 230 235	
30	cat gag tat ccc cat gta cct tgg tgg caa ctt cca tct gta tat aag	769
	His Glu Tyr Pro His Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys	
	240 245 250 255	
35	cag aga gta ttc aac aat tca gta acc aat tcg taatctagag catgcgc	819
	Gln Arg Val Phe Asn Asn Ser Val Thr Asn Ser	
	260 265	
40	<210> 145	
	<211> 266	
	<212> PRT	
45	<213> Nostoc punctiforme ATCC 29133	
50	<400> 145	

## 219

	Met	His	Leu	Glu	Met	Asn	Phe	Cys	Asp	Lys	Pro	Val	Ser	Tyr	Tyr	Val
	1				5					10					15	
5	Ala	Ile	Glu	Gln	Leu	Ser	Ala	Lys	Glu	Asp	Thr	Val	Trp	Gly	Leu	Val
				20					25					30		
10	Ile	Val	Ile	Val	Ile	Ile	Ser	Leu	Trp	Val	Ala	Ser	Leu	Ala	Phe	Leu
		35						40					45			
15	Leu	Ala	Ile	Asn	Tyr	Ala	Lys	Val	Pro	Ile	Trp	Leu	Ile	Pro	Ile	Ala
		50					55					60				
20	Ile	Val	Trp	Gln	Met	Phe	Leu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Phe	Ile	Thr	Ala	His
	65					70					75					80
25	Asp	Ala	Met	His	Gly	Ser	Val	Tyr	Arg	Lys	Asn	Pro	Lys	Ile	Asn	Asn
					85					90					95	
30	Phe	Ile	Gly	Ser	Leu	Ala	Val	Ala	Leu	Tyr	Ala	Val	Phe	Pro	Tyr	Gln
			100						105					110		
35	Gln	Met	Leu	Lys	Asn	His	Cys	Leu	His	His	Arg	His	Pro	Ala	Ser	Glu
		115						120					125			
40	Val	Asp	Pro	Asp	Phe	His	Asp	Gly	Lys	Arg	Thr	Asn	Ala	Ile	Phe	Trp
		130						135					140			
45	Tyr	Leu	His	Phe	Met	Ile	Glu	Tyr	Ser	Ser	Trp	Gln	Gln	Leu	Ile	Val
	145					150					155				160	
50	Leu	Thr	Ile	Leu	Phe	Asn	Leu	Ala	Lys	Tyr	Val	Leu	His	Ile	His	Gln
					165					170					175	
55	Ile	Asn	Leu	Ile	Leu	Phe	Trp	Ser	Ile	Pro	Pro	Ile	Leu	Ser	Ser	Ile
					180				185					190		
60	Gln	Leu	Phe	Tyr	Phe	Gly	Thr	Phe	Leu	Pro	His	Arg	Glu	Pro	Lys	Lys
		195						200					205			

## 220

5 Gly Tyr Val Tyr Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe  
210 215 220

10 Leu Ser Phe Ile Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His  
225 230 235 240

15 Glu Tyr Pro His Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln  
245 250 255

20 Arg Val Phe Asn Asn Ser Val Thr Asn Ser  
260 265

<210> 146

<211> 33

<212> DNA

25 <213> Künstliche Sequenz

30 <220>

<221> Primer

<222> (1) .. (33)

35 <223>

40 <400> 146  
gcgcacatgcac ctagaaatgg cgatcgccat tat 33

<210> 147

45 <211> 32

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

50

<220>

5 <221> Primer

<222> (1)..(32)

<223>

10

<400> 147  
gcgcatgctc tagatcacaa atttgattta ga 32

15

<210> 148

<211> 720

20 <212> DNA

<213> Nodularia spumigena NSOR10

25

<220>

<221> CDS

30 <222> (5)..(703)

<223>

35

<400> 148  
gcgc atg cat cta gaa atg gcg atc gcc att att agt ata tgg gct atc 49  
Met His Leu Glu Met Ala Ile Ala Ile Ile Ser Ile Trp Ala Ile  
40 1 5 10 15

agc cta ggt ttg tta ctt tat att gat ata tcc caa ttc aag ttt tgg 97  
Ser Leu Gly Leu Leu Leu Tyr Ile Asp Ile Ser Gln Phe Lys Phe Trp  
20 25 30

45 atg ttg tta ccg ctc ata ttt tgg caa aca ttt tta tat acg gga tta 145  
Met Leu Leu Pro Leu Ile Phe Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu  
35 40 45

50 ttt att aca gct cat gat gcc atg cat ggg gta gtt ttt ccc aaa aat 193



## 222

	Phe	Ile	Thr	Ala	His	Asp	Ala	Met	His	Gly	Val	Val	Phe	Pro	Lys	Asn	
	50				55				60								
5	ccc	aaa	atc	aac	cat	ttc	att	ggc	tca	ttg	tgc	ctg	ttt	ctt	tat	ggc	241
	Pro	Lys	Ile	Asn	His	Phe	Ile	Gly	Ser	Leu	Cys	Leu	Phe	Leu	Tyr	Gly	
	65				70				75								
10	ctt	tta	cct	tat	caa	aaa	ctt	tta	aaa	aag	cat	tgg	cta	cat	cac	cat	289
	Leu	Leu	Pro	Tyr	Gln	Lys	Leu	Leu	Lys	Lys	His	Trp	Leu	His	His	His	
	80				85				90				95				
15	aat	cca	gcc	agt	gaa	aca	gat	cca	gat	ttt	cac	aac	ggg	aag	cag	aaa	337
	Asn	Pro	Ala	Ser	Glu	Thr	Asp	Pro	Asp	Phe	His	Asn	Gly	Lys	Gln	Lys	
	100				105				110								
20	aac	ttt	ttt	gct	tgg	tat	tta	tat	ttt	atg	aag	cgt	tac	tgg	agt	tgg	385
	Asn	Phe	Phe	Ala	Trp	Tyr	Leu	Tyr	Phe	Met	Lys	Arg	Tyr	Trp	Ser	Trp	
	115				120				125								
25	tta	caa	att	atc	aca	tta	atg	att	att	tat	aac	tta	cta	aaa	tat	ata	433
	Leu	Gln	Ile	Ile	Thr	Leu	Met	Ile	Ile	Tyr	Asn	Leu	Leu	Lys	Tyr	Ile	
	130				135				140								
30	tgg	cat	ttt	cca	gag	gat	aat	atg	act	tat	ttt	tgg	gta	gtt	ccc	tca	481
	Trp	His	Phe	Pro	Glu	Asp	Asn	Met	Thr	Tyr	Phe	Trp	Val	Val	Pro	Ser	
	145				150				155								
35	att	tta	agt	tct	tta	caa	tta	ttt	tat	ttt	gga	act	ttt	cta	ccc	cac	529
	Ile	Leu	Ser	Ser	Leu	Gln	Leu	Phe	Tyr	Phe	Gly	Thr	Phe	Leu	Pro	His	
	160				165				170				175				
40	agt	gag	cct	gta	gaa	ggc	tat	aaa	gag	cct	cat	cgt	tcc	caa	act	att	577
	Ser	Glu	Pro	Val	Glu	Gly	Tyr	Lys	Glu	Pro	His	Arg	Ser	Gln	Thr	Ile	
	180				185				190								
45	agc	cgt	ccc	att	tgg	tgg	tca	ttt	ata	act	tgt	tac	cat	ttt	ggc	tat	625
	Ser	Arg	Pro	Ile	Trp	Trp	Ser	Phe	Ile	Thr	Cys	Tyr	His	Phe	Gly	Tyr	
	195				200				205								
50	cat	tac	gaa	cat	cat	gaa	tac	ccc	cat	gtt	cct	tgg	tgg	caa	tta	cca	673
	His	Tyr	Glu	His	His	Glu	Tyr	Pro	His	Val	Pro	Trp	Trp	Gln	Leu	Pro	
	210				215				220								
55	gaa	att	tat	aaa	atg	tct	aaa	tca	aat	ttg	tgatctagag	catgcgc					720
	Glu	Ile	Tyr	Lys	Met	Ser	Lys	Ser	Asn	Leu							
	225				230												
	<210> 149																

## 223

&lt;211&gt; 233

&lt;212&gt; PRT

5 &lt;213&gt; Nodularia spumigena NSOR10

&lt;400&gt; 149

10

Met His Leu Glu Met Ala Ile Ala Ile Ile Ser Ile Trp Ala Ile Ser  
 1 5 10 15

15 Leu Gly Leu Leu Leu Tyr Ile Asp Ile Ser Gln Phe Lys Phe Trp Met  
 20 25 30

20 Leu Leu Pro Leu Ile Phe Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe  
 35 40 45

25 Ile Thr Ala His Asp Ala Met His Gly Val Val Phe Pro Lys Asn Pro  
 50 55 60

Lys Ile Asn His Phe Ile Gly Ser Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Gly Leu  
 65 70 75 80

30 Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His His Asn  
 85 90 95

35 Pro Ala Ser Glu Thr Asp Pro Asp Phe His Asn Gly Lys Gln Lys Asn  
 100 105 110

40 Phe Phe Ala Trp Tyr Leu Tyr Phe Met Lys Arg Tyr Trp Ser Trp Leu  
 115 120 125

45 Gln Ile Ile Thr Leu Met Ile Ile Tyr Asn Leu Leu Lys Tyr Ile Trp  
 130 135 140

His Phe Pro Glu Asp Asn Met Thr Tyr Phe Trp Val Val Pro Ser Ile  
 145 150 155 160

50

## 224

Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser  
 165 170 175

5 Glu Pro Val Glu Gly Tyr Lys Glu Pro His Arg Ser Gln Thr Ile Ser  
 180 185 190

10 Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His  
 195 200 205

15 Tyr Glu His His Glu Tyr Pro His Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Glu  
 210 215 220

Ile Tyr Lys Met Ser Lys Ser Asn Leu  
 225 230

20 <210> 150  
 <211> 24

25 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

30 <220>  
 <221> Primer

35 <222> (1)..(24)  
 <223>

40 <400> 150  
 gaattcctgc aatagaatgt tgag

45 <210> 151  
 <211> . 25  
 <212> DNA

50

<213> Künstliche Sequenz

5 <220>

<221> Primer

<222> (1)..(25)

10 <223>

15 <400> 151  
ctcgagctta cgagcatttt ctaag 25

<210> 152

20 <211> 25

<212> .DNA

25 <213> Künstliche Sequenz

<220>

30 <221> Primer

<222> (1)..(25)

35 <223>

<400> 152

40 gaattcccaa taataatcta cagcc 25

<210> 153

45 <211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

50

<220>

5 <221> Primer

<222> (1) .. (25)

<223>

10

<400> 153  
aagcttgac gagcctctct ctatt

25

15

<210> 154

<211> 25

20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

25

<220>

<221> Primer

30

<222> (1) .. (25)

<223>

35

<400> 154  
gtcgacctct ccattttttc ttcaa

25

40

<210> 155

<211> 22

45

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

50

<220>

<221> Primer

5 <222> (1) .. (22)

<223>

10

<400> 155  
gaattcggca cgagcctctc tc 22

15 <210> 156

<211> 23

<212> DNA

20 <213> Künstliche Sequenz

25 <220>

<221> Primer

<222> (1) .. (23)

30 <223>

35 <400> 156  
ggatcctctc cattttttct tca 23

<210> 157

40 <211> 24

<212> DNA

45 <213> Künstliche Sequenz

<220>

50

<221> Primer

<222> (1) .. (24)

5 <223>

<400> 157

10 gagctctagc gcaatcttat gtgg 24

<210> 158

15 <211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

20

<220>

25 <221> Primer

<222> (1) .. (22)

<223>

30

<400> 158

35 ccatgggttct cacttctgta tg 22

<210> 159

<211> 25

40 <212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

45

<220>

<221> Primer

50

<222> (1) .. (25)

<223>

5

<400> 159

aagcttccat ggcggccgga atttc

25

10

<210> 160

<211> 307

15

<212> DNA

<213> Vicia faba

20

<220>

<221> Terminator

25

<222> (1) .. (307)

<223>

30

<400> 160

gaattcctgc aatagaatgt tgagggtgacc actttctgta ataaaataat tataaaataa 60

atttagaatt gctgtagtca agaacatcag ttctaaaata ttaataaagt tatggccttt 120

35

tgacatatgt gtttcgataa aaaaatcaaa ataaattgag atttattcga aatacaatga 180

aagtttgcag atatgagata tgtttctaca aaataataac ttaaaactca actatatgct 240

40

aatgtttttc ttggtgtggt tcatagaaaa ttgtatccgt ttcttagaaa atgctcgtaa 300

gctcgag 307

45

<210> 161

<211> 1020

<212> DNA

50



<213> Lycopersicon esculentum

5 <220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(1020)

10

<223> Nukleinsäure codierend für ein b-Hydroxylase

15 <400> 161

aagcttccat ggcggccgga atttcagcct ccgctagtcc ccgaaccatt cgcctccgtc 60

ataaccggtt tctcagtcca aaatccgcct caaccgcccc gccggttctg ttcttctctc 120

20 cgttaactcg caattttggc gcaattttgc tgtctagaag aaagccgaga ttggcggttt 180

gttttgtgct ggagaatgag aaattgaata gtactatcga aagtgagagt gaagtaatag 240

aggatcggat acaagtagag attaatgagg agaagagttt agctgccagt tggctggcgg 300

25

agaaattggc gaggaagaaa tcggagaggt ttacttatct tgtggcagct gtgatgtcta 360

gtttggggat tacttctatg gcgattttgg cggtttatta cagattttca tggcaaatgg 420

30 aggggtggaga agtgcctttt tctgaaatgt tagctacatt cactctctcg tttggcgctg 480

ccgtaggaat ggagtactgg gcgagatggg ctcatagagc actatggcat gcttctttat 540

ggcacatgca cgagtcgcac catagaccaa gagaaggacc ttttgagatg aacgacgttt 600

35

tcgccataac aaatgctgtt ccagctatag gtcttctttc ctacggtttc ttccataaag 660

ggatcgtecc tggcctctgt ttcggcgctg gattggggat cacagtatth gggatggctt 720

40 acatgttcgt tcacgatgga ctggttcata agagatttcc cgtagggcct attgccaacg 780

tgccttactt tcggagggtg gctgcagcac atcagcttca tcaactcgac aaatttgatg 840

gtgtcccata tggcttggtt ctaggacctg aggaattgga agaagtagga ggacttgaag 900

45

agttagaaaa ggaagtcaac cgaaggatta aaatttctaa gggattatta tgatcaaaag 960

atacgtctga taataataaa atgcgattgt atttaggctg tagattatta ttgggaattc 1020

50

<210> 162

<211> 1802

5 <212> DNA

<213> Petunia hybrida

10 <220>

<221> Promotor

15 <222> (1) .. (1802)

<223>

20 <400> 162

gagctctagc gcaatcttat gtggtacaaa tcttgattag tcgggaaaaa atgatgtggc 60

cctacaaatg gttggaggat gggagatttg gctctatcta gagttatgtg gttggtgaag 120

25 catttggtta ctctctgctg tggtagttgg catatccaca ttgtctcctt ccacttttat 180

gacaattacg tgaaagttaa gggttgtttt gtctattttt gtcgaggcct ttcttttcct 240

30 tccaggttgt tgaagatggt ccaattcgat tagaataatg ttttgagcct tagcatattc 300

tctctcgttt acacgattat agtaataatg atataggatg acagaagttg acacataaat 360

tttttattct ctccatttac tttaatccaa atctcaccta ccctaaactt ctttaatatg 420

35 tattcaatag tctatccgag taaattgtaa atttaacaac cattgataat attgacacct 480

actaacatat actagtaaag agaattattaa catggcacat ataatttgat gcaaaatgag 540

40 tatgatgaaa tttaaaccce aaatctcttg attttgacag tgtcaccttg acttggttaac 600

taataagtca tgtttttagtg gcagaaagac aaactcatcc accaactgta tagcaataaa 660

aaatagaaga atcttctctga ggcaaagttt tggaaaaatt aagagtggct gagatttaac 720

45 ttcaacagga attagttcca cttaactttt aggttacgat acagtgtctaa ttaaataact 780

taattgtatt agatatttct tgcacctaaa aaatttaaaa actgaaaaaa ggtagcaatc 840

50 aaaataaaca aaaggacaaa ataagtgaag ggtacagcca ccaaccctgg cggtcactg 900

	tttgttggtt	aaaacgtaga	cttacaccta	cctaaaatcta	caactaaaat	gaggcaataa	960
	tactttgccc	aaaattacca	agaaaagaaa	aagaaaggaa	tcctttaata	ttactctcct	1020
5	ccatttcaca	ataaatatcc	tagtttgact	taaattagag	tttaaaaaat	gaaagacgac	1080
	ttttaaaact	tgtaatctaa	aataaatcat	agttaaatgt	gtggctataa	atcattgtat	1140
10	taacggtaaa	gtggtaagtt	taaaagttaa	ttgttttcaa	atataaaatt	gtactatcat	1200
	tctttttgga	atggactaat	aagaaaacta	tgacatccat	tatggagcgg	agggagatc	1260
	tccttttaac	aataaccttt	gtcccttcaa	ttcaattatc	agtatgcaa	cattaaaaat	1320
15	tattattgat	gttaagtacc	acatcatcct	taatgataga	atcatcgtag	aacgcttttc	1380
	caggcacaca	ttcaaactag	ttagaccagt	accacacatc	gaatattcca	gacttctttg	1440
20	tttgaatagt	cgactacatt	ggataatgga	acttctcgaa	ttacttcga	attagtcgag	1500
	cccaaaataa	tatatacgtc	gggtggaaaa	ctataaaatg	tttgacaaaa	atgtcaaatt	1560
	aatatatcaa	tctgcaacaa	ccttttcacc	ttgagaacac	agctgaaatt	ttttacaaag	1620
25	gtagttggtg	aagctagtca	gcgaatccca	ttaccttcca	ctctacctaa	cccccttcac	1680
	caacaacaaa	tttctgtaat	ttaaaaacta	gccaaaaaag	aactctcttt	tacaaagagc	1740
30	caaagactca	atctttactt	tcaagaaaag	ctttgcaatt	catacagaag	tgagaaccat	1800
	gg						1802
35	<210>	163					
	<211>	332					
	<212>	DNA					
40	<213>	Tagetes erceta					
45	<220>						
	<221>	misc_feature					
	<222>	(1) .. (332)					
50							

## 233

&lt;223&gt; b-Hydroxylase Sense-Fragment

5 <400> 163  
aagcttgcac gagcctctct ctatttttac acttcaatgg cggcagcaat tgctgtccct 60  
tgtagctcaa gaccatttgg cttaggtcga atgcggttac ttggtcataa acccacaacc 120  
10 ataacttgtc acttccccctt ttctttttct atcaaatcat ttaccccaat tgttaggggc 180  
agaagatgta ctgtttgttt tgttgccggt ggcgacagta atagtaacag taataataat 240  
agtgacagta atagtaataa tccgggtctg gatttaaacc cggcgggtat gaaccgtaac 300  
15 cgtttggttg aagaaaaaat ggagaggteg ac 332

&lt;210&gt; 164

20

&lt;211&gt; 332

&lt;212&gt; DNA

25 &lt;213&gt; Tagetes erecta

&lt;220&gt;

30

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1) .. (332)

35 &lt;223&gt; b-Hydroxylase Antisense-Fragment

40 <400> 164  
gaattcggca cgagcctctc tctattttta cacttcaatg gcggcagcaa ttgctgtccc 60  
ttgtagctca agaccatttg gcttaggtcg aatgcggtta cttggtcata aaccacaac 120  
cataacttgt cacttccccct tttctttttc tatcaaatca ttaccccaa ttgtagggg 180  
45 cagaagatgt actgtttggt ttgttgccgg tggcgacagt aatagtaaca gtaataataa 240  
tagtgacagt aatagtaata atccgggtct ggatttaaac ccggcgggta tgaaccgtaa 300  
50 ccgtttggtt gaagaaaaaa tggagaggat cc 332

<210> 165  
 5 <211> 996  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
 10  
 <220>  
 15 <221> misc\_feature  
 <222> (1) .. (996)  
 <223>  
 20  
 <400> 165  
 25 ggcacgagcc tctctctatt ttacacttc aatggcggca gcaattgctg tccctttag 60  
 ctcaagacca ttggccttag gtcgaatgcg gttacttggc cataaaccac caaccataac 120  
 ttgtcacttc cccttttctt ttctatcaa atcatttacc ccaattgtta ggggcagaag 180  
 30 atgtactgtt tgttttgttg ccggtggcga cagtaatagt aacagtaata ataatagtga 240  
 cagtaatagt aataatccgg gtctggattt aaaccggcg gttatgaacc gtaaccgttt 300  
 ggttgaagaa aaaatggaga ggaaaaaatc ggaacgattt acttatcttg ttgcagctat 360  
 35 tatgtctact ttggaatta cttcaatggc gggtatggcg gtttattacc ggttttcatg 420  
 gcaaattggag ggtggagaaa ttccttatgt ggagatgttt ggtacatttg ctctctccgt 480  
 40 tgggtgctgcg gtaggaatgg agtattgggc aagatgggct catgaggcac tatggcatgc 540  
 ttctttgttg cacatgcatg agtcacacca taagccacga gaaggccgt ttgagcttaa 600  
 tgatgtgttt gctataacaa atgcgggtccc ggccattgcg ttgcttagtt atgggttttt 660  
 45 ccacaaaggc ataattccgg gtctttgttt tggggcggga ctgggaatta cgggtgtttg 720  
 aatggcgtat atgttcgtcc acgacgggct agttcacaga agattccaag tgggtccgat 780  
 50 tgcgaatgtt ccctatcttc gaaggggttc agcgggtcat cagctgcac acacggaaaa 840

## 235

atttaatggg gttccttatg gcttggttctt gggacctaag gagctagaag aagtgggtgg 900  
tacggaagaa ttggacaagg agattcaaag aagaattaaa ttgtataata atactaaata 960  
5 aataaatttt gtataaaatt aatataattt aatgat 996

10 <210> 166

<211> 19

<212> DNA

15 <213> Künstliche Sequenz

20 <220>

<221> Primer

<222> (1) .. (19)

25 <223>

30 <400> 166

tgccaaagta actctttat

19

<210> 167

35 <211> 19

<212> DNA

40 <213> Künstliche Sequenz

<220>

45 <221> Primer

<222> (1) .. (19)

<223>

50

5           <400> 167  
           aggtgcatga ccaagtaac 19

10           <210> 168  
           <211> 1033  
           <212> DNA  
           <213> Arabidopsis thaliana

15           <220>  
           <221> Promotor  
 20           <222> (1)..(1033)  
           <223> P76

25           <400> 168  
           aggtgcatga ccaagtaaca atttgattcc tttccagcat aacgtcatgt tggttgcaaa 60  
 30           aagaaggcaa agtagagcaa gcaagcaagc aaagcatttt tcttatttta tattttgttg 120  
           cggattccac caccacttg aaaaattgac atgtcacaat gatttcgtat cctagtcttt 180  
           tattatttaa cactctcaca atcccattac tctacacctc tttcattaag tcaacacacg 240  
 35           gttttcaaaa atccactacc ctcccaccac ctagaatctt ttgttaccta ccaacaccct 300  
           cctttgttct ctttatatat tgggtccaact aaatcaataa gggaaagcat ccttttggtt 360  
 40           ggaggaattg ctttcattct cactctttgt gtgttgatca atggactagc taataacaag 420  
           ttcctcctct atatatattca aaagaatgga acagaaacat aaacgaaaga cagagtacct 480  
           gatgttgatg attcattgtc tgtctggagc tcccaaagtc cttttatgct tacataatca 540  
 45           taaccaacaa cggctattaa ttataaacca aaaacacgaa ataagtttgt agcaaagtga 600  
           aattaggaat cttggagatg gatccattag tagtaggata ataggatatg atggaatttg 660  
 50           gttggggaac agtgataact tacgcttgct tccggcgccg ggaaagttgg aaacctaca 720

## 237

aagtacagaa atggatctgg gccttgaagt gggcttttta ttaaagaaaa aaatacatct 780  
ccgttatcaa tcaccatctt cttctatcta caaattaaag aaggtaacaa cagaacgtgg 840  
5 tggatcatgt ggtaggcat taattatttg ctttgtttcg ccgttttggt aacacacaga 900  
cacagttccg gtaagagctt ttgcagccac tctttatagt tatttagaat tggcgatcga 960  
10 atcaatctca ctccctccct cccttaagtc ttgttgaatc tgetgaattg tttataaaag 1020  
agttactttg gca 1033

15 <210> 169

<211> 18

<212> DNA

20

<213> Künstliche Sequenz

25 <220>

<221> Primer

<222> (1)..(18)

30

<223>

35

<400> 169

atggaagctc ttctcaag

18

<210> 170

40

<211> 18

<212> DNA

45

<213> Künstliche Sequenz

<220>

50



<221> Primer  
 <222> (1) .. (18)  
 5 <223>

<400> 170  
 10 accttaccta aaacattt 18

<210> 171  
 15 <211> 1666  
 <212> DNA  
 <213> Lycopersicon esculentum  
 20

<220>  
 25 <221> CDS  
 <222> (1) .. (1494)  
 <223>  
 30

<400> 171  
 35 atg gaa gct ctt ctc aag cct ttt cca tct ctt tta ctt tcc tct cct 48  
 Met Glu Ala Leu Leu Lys Pro Phe Pro Ser Leu Leu Leu Ser Ser Pro  
 1 5 10 15

40 aca ccc cat agg tct att ttc caa caa aat ccc tct ttt cta agt ccc 96  
 Thr Pro His Arg Ser Ile Phe Gln Gln Asn Pro Ser Phe Leu Ser Pro  
 20 25 30

45 acc acc aaa aaa aaa tca aga aaa tgt ctt ctt aga aac aaa agt agt 144  
 Thr Thr Lys Lys Lys Ser Arg Lys Cys Leu Leu Arg Asn Lys Ser Ser  
 35 40 45

50 aaa ctt ttt tgt agc ttt ctt gat tta gca ccc aca tca aag cca gag 192  
 Lys Leu Phe Cys Ser Phe Leu Asp Leu Ala Pro Thr Ser Lys Pro Glu  
 50 55 60

50 tct tta gat gtt aac atc tca tgg gtt gat cct aat tcg aat cgg gct 240

## 239

	Ser	Leu	Asp	Val	Asn	Ile	Ser	Trp	Val	Asp	Pro	Asn	Ser	Asn	Arg	Ala	
	65					70					75					80	
5	caa	ttc	gac	gtg	atc	att	atc	gga	gct	ggc	cct	gct	ggg	ctc	agg	cta	288
	Gln	Phe	Asp	Val	Ile	Ile	Ile	Gly	Ala	Gly	Pro	Ala	Gly	Leu	Arg	Leu	
					85					90					95		
10	gct	gaa	caa	gtt	tct	aaa	tat	ggc	att	aag	gta	tgt	tgt	gtt	gac	cct	336
	Ala	Glu	Gln	Val	Ser	Lys	Tyr	Gly	Ile	Lys	Val	Cys	Cys	Val	Asp	Pro	
				100					105					110			
15	tca	cca	ctc	tcc	atg	tgg	cca	aat	aat	tat	ggc	gtt	tgg	gtt	gat	gag	384
	Ser	Pro	Leu	Ser	Met	Trp	Pro	Asn	Asn	Tyr	Gly	Val	Trp	Val	Asp	Glu	
			115					120					125				
	ttt	gag	aat	tta	gga	ctg	gaa	aat	tgt	tta	gat	cat	aaa	tgg	cct	atg	432
	Phe	Glu	Asn	Leu	Gly	Leu	Glu	Asn	Cys	Leu	Asp	His	Lys	Trp	Pro	Met	
		130					135					140					
20	act	tgt	gtg	cat	ata	aat	gat	aac	aaa	act	aag	tat	ttg	gga	aga	cca	480
	Thr	Cys	Val	His	Ile	Asn	Asp	Asn	Lys	Thr	Lys	Tyr	Leu	Gly	Arg	Pro	
	145					150					155				160		
25	tat	ggc	aga	gtt	agt	aga	aag	aag	ctg	aag	ttg	aaa	ttg	ttg	aat	agt	528
	Tyr	Gly	Arg	Val	Ser	Arg	Lys	Lys	Leu	Lys	Leu	Lys	Leu	Leu	Asn	Ser	
				165					170					175			
30	tgt	gtt	gag	aac	aga	gtg	aag	ttt	tat	aaa	gct	aag	gtt	tgg	aaa	gtg	576
	Cys	Val	Glu	Asn	Arg	Val	Lys	Phe	Tyr	Lys	Ala	Lys	Val	Trp	Lys	Val	
			180					185					190				
35	gaa	cat	gaa	gaa	ttt	gag	tct	tca	att	gtt	tgt	gat	gat	ggc	aag	aag	624
	Glu	His	Glu	Glu	Phe	Glu	Ser	Ser	Ile	Val	Cys	Asp	Asp	Gly	Lys	Lys	
		195						200					205				
	ata	aga	ggc	agt	ttg	gtt	gtg	gat	gca	agt	ggc	ttt	gct	agt	gat	ttt	672
	Ile	Arg	Gly	Ser	Leu	Val	Val	Asp	Ala	Ser	Gly	Phe	Ala	Ser	Asp	Phe	
		210					215					220					
40	ata	gag	tat	gac	agg	cca	aga	aac	cat	ggc	tat	caa	att	gct	cat	ggg	720
	Ile	Glu	Tyr	Asp	Arg	Pro	Arg	Asn	His	Gly	Tyr	Gln	Ile	Ala	His	Gly	
	225					230					235				240		
45	gtt	tta	gta	gaa	gtt	gat	aat	cat	cca	ttt	gat	ttg	gat	aaa	atg	gtg	768
	Val	Leu	Val	Glu	Val	Asp	Asn	His	Pro	Phe	Asp	Leu	Asp	Lys	Met	Val	
				245					250					255			
50	ctt	atg	gat	tgg	agg	gat	tct	cat	ttg	ggc	aat	gag	cca	tat	tta	agg	816
	Leu	Met	Asp	Trp	Arg	Asp	Ser	His	Leu	Gly	Asn	Glu	Pro	Tyr	Leu	Arg	
			260						265					270			

## 240

	gtg aat aat gct aaa gaa cca aca ttc ttg tat gca atg cca ttt gat	864
	Val Asn Asn Ala Lys Glu Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro Phe Asp	
	275 280 285	
5	aga gat ttg gtt ttc ttg gaa gag act tct ttg gtg agt cgt cct gtt	912
	Arg Asp Leu Val Phe Leu Glu Glu Thr Ser Leu Val Ser Arg Pro Val	
	290 295 300	
10	tta tcg tat atg gaa gta aaa aga agg atg gtg gca aga tta agg cat	960
	Leu Ser Tyr Met Glu Val Lys Arg Arg Met Val Ala Arg Leu Arg His	
	305 310 315 320	
15	ttg ggg atc aaa gtg aaa agt gtt att gag gaa gag aaa tgt gtg atc	1008
	Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Val Ile Glu Glu Glu Lys Cys Val Ile	
	325 330 335	
20	cct atg gga gga cca ctt ccg cgg att cct caa aat gtt atg gct att	1056
	Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Arg Ile Pro Gln Asn Val Met Ala Ile	
	340 345 350	
25	ggg ggg aat tca ggg ata gtt cat cca tca aca ggg tac atg gtg gct	1104
	Gly Gly Asn Ser Gly Ile Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met Val Ala	
	355 360 365	
	agg agc atg gct tta gca cca gta cta gct gaa gcc atc gtc gag ggg	1152
	Arg Ser Met Ala Leu Ala Pro Val Leu Ala Glu Ala Ile Val Glu Gly	
	370 375 380	
30	ctt ggc tca aca aga atg ata aga ggg tct caa ctt tac cat aga gtt	1200
	Leu Gly Ser Thr Arg Met Ile Arg Gly Ser Gln Leu Tyr His Arg Val	
	385 390 395 400	
35	tgg aat ggt ttg tgg cct ttg gat aga aga tgt gtt aga gaa tgt tat	1248
	Trp Asn Gly Leu Trp Pro Leu Asp Arg Arg Cys Val Arg Glu Cys Tyr	
	405 410 415	
40	tca ttt ggg atg gag aca ttg ttg aag ctt gat ttg aaa ggg act agg	1296
	Ser Phe Gly Met Glu Thr Leu Leu Lys Leu Asp Leu Lys Gly Thr Arg	
	420 425 430	
45	aga ttg ttt gac gct ttc ttt gat ctt gat cct aaa tac tgg caa ggg	1344
	Arg Leu Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Asp Pro Lys Tyr Trp Gln Gly	
	435 440 445	
	ttc ctt tct tca aga ttg tct gtc aaa gaa ctt ggt tta ctc agc ttg	1392
	Phe Leu Ser Ser Arg Leu Ser Val Lys Glu Leu Gly Leu Leu Ser Leu	
	450 455 460	
50	tgt ctt ttc gga cat ggc tca aac atg act agg ttg gat att gtt aca	1440

## 241

[illegible]

242

Gln Phe Asp Val Ile Ile Ile Gly Ala Gly Pro Ala Gly Leu Arg Leu  
85 90 95

5 Ala Glu Gln Val Ser Lys Tyr Gly Ile Lys Val Cys Cys Val Asp Pro  
100 105 110

10 Ser Pro Leu Ser Met Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val Asp Glu  
115 120 125

15 Phe Glu Asn Leu Gly Leu Glu Asn Cys Leu Asp His Lys Trp Pro Met  
130 135 140

20 Thr Cys Val His Ile Asn Asp Asn Lys Thr Lys Tyr Leu Gly Arg Pro  
145 150 155 160

Tyr Gly Arg Val Ser Arg Lys Lys Leu Lys Leu Lys Leu Leu Asn Ser  
165 170 175

25 Cys Val Glu Asn Arg Val Lys Phe Tyr Lys Ala Lys Val Trp Lys Val  
180 185 190

30 Glu His Glu Glu Phe Glu Ser Ser Ile Val Cys Asp Asp Gly Lys Lys  
195 200 205

35 Ile Arg Gly Ser Leu Val Val Asp Ala Ser Gly Phe Ala Ser Asp Phe  
210 215 220

Ile Glu Tyr Asp Arg Pro Arg Asn His Gly Tyr Gln Ile Ala His Gly  
225 230 235 240

40 Val Leu Val Glu Val Asp Asn His Pro Phe Asp Leu Asp Lys Met Val  
245 250 255

45 Leu Met Asp Trp Arg Asp Ser His Leu Gly Asn Glu Pro Tyr Leu Arg  
260 265 270

50 Val Asn Asn Ala Lys Glu Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro Phe Asp  
275 280 285

243

5 Arg Asp Leu Val Phe Leu Glu Glu Thr Ser Leu Val Ser Arg Pro Val  
290 295 300

10 Leu Ser Tyr Met Glu Val Lys Arg Arg Met Val Ala Arg Leu Arg His  
305 310 315 320

15 Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Val Ile Glu Glu Glu Lys Cys Val Ile  
325 330 335

20 Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Arg Ile Pro Gln Asn Val Met Ala Ile  
340 345 350

25 Gly Gly Asn Ser Gly Ile Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met Val Ala  
355 360 365

30 Arg Ser Met Ala Leu Ala Pro Val Leu Ala Glu Ala Ile Val Glu Gly  
370 375 380

35 Leu Gly Ser Thr Arg Met Ile Arg Gly Ser Gln Leu Tyr His Arg Val  
385 390 395 400

40 Trp Asn Gly Leu Trp Pro Leu Asp Arg Arg Cys Val Arg Glu Cys Tyr  
405 410 415

45 Ser Phe Gly Met Glu Thr Leu Leu Lys Leu Asp Leu Lys Gly Thr Arg  
420 425 430

50 Arg Leu Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Asp Pro Lys Tyr Trp Gln Gly  
435 440 445

Phe Leu Ser Ser Arg Leu Ser Val Lys Glu Leu Gly Leu Leu Ser Leu  
450 455 460

Cys Leu Phe Gly His Gly Ser Asn Met Thr Arg Leu Asp Ile Val Thr  
465 470 475 480

PF 53862  
WO 2004/018693

PCT/EP03/0910  
PCT/EP2003/009102

244

Lys Cys Pro Leu Pro Leu Val Arg Leu Ile Gly Asn Leu Ala Ile Glu  
485 490 495

5 Ser Leu